



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

Papel de MKP1 en carcinogénesis y en respuesta a agentes quimioterápicos

TESIS DOCTORAL

VANESSA RODRÍGUEZ FANJUL

Madrid, 2011

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Papel de MKP1 en carcinogénesis y en respuesta a agentes quimioterápicos

Memoria que presenta

Vanessa Rodríguez Fanjul

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Directores de la tesis:

Dra. Rosario Perona Abellón

Profesor de Investigación

Dra. M^a Isabel Sánchez Pérez

Profesor Contratado Doctor

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
CSIC-UAM



Por la presente, **Rosario Perona Abellón**, Doctora en Farmacia y Profesor de Investigación del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Madrid, y **M^a Isabel Sánchez Pérez**, Doctor en Ciencias y Profesor Contratado Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, adscrita al Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, certifican que:

Dña. Vanessa Rodríguez Fanjul, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada: **“Papel de MKP1 en carcinogénesis y en respuesta a agentes quimioterápicos”** en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a veinticinco de Abril de dos mil once.

Dra. Rosario Perona Abellón

Director de la Tesis
Profesor de Investigación
CSIC

Dra. M^a Isabel Sánchez Pérez

Director de la Tesis
Profesor Contratado Doctor
Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecerle a mi directora de Tesis, la Dra. Rosario Perona, su apoyo, confianza y enseñanzas en mi formación como investigadora, sin los cuales nunca hubiera llegado tan lejos en el mundo de la ciencia. También a mi co-directora de Tesis, la Dra. Isabel Sánchez Pérez, por su apoyo y ayuda en todo momento.

A toda mi familia, especialmente a mis padres, por estar siempre ahí en los buenos y malos momentos. Gracias porque aunque sin llegar a comprender muy bien en lo que andaba metida, siempre me habeis animado con todo vuestro cariño para que no abandonara en los momentos en los que una tesis deja de tener sentido.

Y por último, a todos vosotros (que sois muchos y no voy a nombrar porque sería injusto olvidarme de alguno), por vuestra amistad, cariño y apoyo y por haber contribuido a que esta Tesis se haya hecho realidad.

Gracias a todos!!!

Resumen

RESUMEN

MKP1 es un miembro de la familia de fosfatasa de especificidad dual que pueden desfosforilar e inactivar a las tres principales proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), ERK1/2, JNK1/2 y p38. Muchos agentes quimioterápicos como el cis-Platino (CDDP) inducen apoptosis en las células tumorales mediante la activación de las vías JNK1/2 y p38. La capacidad que tiene MKP1 para disminuir la actividad de estas quinasas resulta en protección contra la apoptosis y resistencia a la droga, que es uno de los principales obstáculos en el tratamiento del cáncer. El carboplatino (CBDCA) es un derivado del CDDP que se utiliza en el tratamiento de diversos tumores sólidos, entre ellos el carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP), y que presenta ciertas ventajas clínicas respecto al CDDP ya que es menos nefrotóxico, ototóxico y neurotóxico que éste. Sin embargo, se ha observado desarrollo de resistencia a CBDCA en el tratamiento del CNMP, por lo que uno de los objetivos de este trabajo es estudiar el mecanismo molecular que produce resistencia a CBDCA en este tipo de tumores con el fin de encontrar una mejora de la eficacia terapéutica. Nuestros resultados indican que la regulación de las rutas de supervivencia ERK1/2 y NFκB por MKP1 en respuesta a CBDCA puede tener un papel fundamental en la resistencia al tratamiento de algunas líneas celulares derivadas de CNMP, por lo que la regulación de la fosfatasa MKP1 es específica para la respuesta al tratamiento de determinados tipos de tumores de pulmón. Diversos estudios han relacionado a MKP1 con la carcinogénesis y promoción tumoral del CNMP, tumor en el que se ha observado un alto porcentaje de mutaciones en el oncogén K-Ras. El cáncer de piel es otro tipo de neoplasia en la que comúnmente se producen mutaciones de otro miembro de la familia Ras, el oncogén H-Ras. Sin embargo, no existen evidencias en la literatura que relacionen a MKP1 con el cáncer cutáneo. Por ello, nos propusimos estudiar por un lado el papel de MKP1 en la tumorogénesis de pulmón inducida por K-Ras, y por otro, la implicación de esta fosfatasa en la carcinogénesis y desarrollo de tumores de piel. Nuestros resultados muestran que la expresión de MKP1 favorece la tumorogénesis de pulmón inducida por K-Ras en ratones así como la conversión maligna, por lo que esta fosfatasa desempeña un importante papel promotor tumoral en cáncer de pulmón. Sin embargo, la ausencia de expresión de MKP1 produce una mayor susceptibilidad a la tumorogénesis de piel de ratón en respuesta a carcinogénesis química, que es debida a una alteración de la respuesta proliferativa asociada con un aumento en la señalización las vías ERK1/2 y p53. También hemos observado una disminución en los niveles de expresión de MKP1 en carcinoma basocelular (BCC) y escamoso (SCC) humano, lo que indica que esta fosfatasa actúa como supresor tumoral en cáncer de piel. El trabajo presentado sugiere por tanto, que MKP1 podría jugar un papel clave en la resistencia a CBDCA en CNMP y en la tumorogénesis y desarrollo del cáncer de pulmón y piel, por lo que esta fosfatasa podría ser una potencial diana terapéutica en pacientes con este tipo de tumores.

Summary

SUMMARY

MKP1 is a member of the dual-specific family of protein phosphatases that dephosphorylates and inactivates all three major Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), including ERK1/2, JNK1/2 and p38. Many chemotherapeutic drugs as cis-Platin (CDDP) induce apoptosis in cancer cells as a consequence of activation of the JNK1/2 and p38 pathways. The ability of MKP1 to decrease the activity of these kinases results in both, protection from apoptosis and drug resistance that is one of the major obstacles in cancer treatment. Carboplatin (CBDCA) is the CDDP derivative most commonly used to treat non-small cell lung cancer (NSCLC) as it shows more advantages with respect to CDDP treatment such as reduced nephrotoxicity, ototoxicity and neurotoxicity. However, it has been shown that NSCLC frequently exhibits resistance to CBDCA, therefore, one of our objectives is to define the CBDCA-antitumoral mechanism in these tumor types to improve CBDCA clinical outcome. Our results suggest that CBDCA plays a major role in resistance of some NSCLC cell lines by regulation of ERK1/2 and NF κ B pathways, so MKP1 regulation is critical for the response of certain types of lung cancer to CBDCA. MKP1 has been implicated in NSCLC carcinogenesis and tumoral promotion. In addition, K-Ras mutations are frequently found in these types of tumors. Mutations in another member of Ras oncogen family, H-Ras, were identified in skin cancer, however, there is no evidence in the literature of a relationship between MKP1 and skin cancer. On these bases, we decided to study first the role of MKP1 in K-Ras-induced lung tumorigenesis, and second the role of MKP1 in carcinogenesis and tumor development in carcinogen-induced skin cancer. Our results show that MKP1 expression enhances the response of the lung epithelium to K-Ras-induced tumorigenesis and malignant progression, so this phosphatase plays a major role as promoter in lung cancer. However, the absence of MKP1 expression displays increased skin tumor progression susceptibility in response to the multistage chemical mouse skin carcinogenesis as result of an altered proliferative response linked to an enhanced signaling of ERK1/2 and p53 pathways. We have also observed a marked reduction in MKP1 expression levels in human basal (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) in relation to normal skin, indicating that this phosphatase has a suppressor role in skin cancer. Altogether, these results provide a strong evidence for MKP1 having a role in NSCLC-resistance to CBDCA treatment and in the tumorigenesis and development of lung and skin cancer, consequently, this phosphatase could be a novel potential molecular target for lung and skin cancer treatment.

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. El cáncer	11
2. Cáncer de pulmón.....	12
2.1 Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón.....	12
2.2 Tratamiento del cáncer de pulmón.....	13
2.3 Agentes antitumorales utilizados en el tratamiento del CNMP: carboplatino y cis-Platino.....	14
2.4 Biología molecular del cáncer de pulmón	14
2.4.1 Activación de oncogenes en el desarrollo de cáncer de pulmón	15
2.4.2 Inactivación de genes supresores tumorales en el desarrollo de cáncer de pulmón.....	15
2.5 Modelos murinos en cáncer de pulmón	15
2.5.1 Modelos transgénicos murinos en cáncer de pulmón	16
3. Cáncer de piel	18
3.1 La piel	18
3.1.1 Hipodermis.....	18
3.1.2 Dermis.....	18
3.1.3 Epidermis	19
3.2 Tipos de cáncer de piel	20
3.2.1 Cáncer de piel no melanoma	20
3.2.1.1 Carcinoma de Célula Basal (BCC).....	20
3.2.1.2 Carcinoma de Célula Escamosa (SCC)	21
3.2.2 Melanoma maligno.....	21
3.3 Diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de piel	21
3.4 Carcinogénesis de piel.....	23
3.4.1 Iniciación	23
3.4.2 Promoción.....	23
3.4.3 Progresión/Conversión.....	24
4. Proteínas quinasas activadas por mitógenos: MAPKs	25
4.1 Principales vías de señalización de la familia MAPK	26

4.1.1 La vía de ERK	26
4.1.2 La vía de p38	27
4.1.3 La vía de JNK.....	27
4.2 Regulación de la activación de las MAPKs	28
4.3 MAPKs y cáncer.....	28
5. Proteínas fosfatasa de MAPK: MKPs	28
5.1 MKP1	29
5.1.1 MKP1 y cáncer.....	29
6. El factor de transcripción NFκB	30
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Reactivos y agentes quimioterápicos	37
2. Plásmidos y cepas bacterianas	37
3. Líneas celulares, cultivo y conservación de las líneas celulares	39
4. Generación de fibroblastos embrionarios murinos y condiciones de cultivo.....	40
5. Tratamientos de líneas celulares y de MEFs	41
6. Transfección de células	41
6.1 Transfección por precipitación con fosfato cálcico	41
6.2 Transfección transitoria mediante Lipofectamina 2000	42
7. Ensayo de viabilidad celular mediante la técnica cristal violeta	42
8. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	42
9. Medida de expresión génica	43
9.1 Expresión de genes mediante Q-RT-PCR	43
9.1.1 Muestras de pacientes	43
9.1.2 Extracción de ARN total procedente de tejido humano.....	43
9.1.3 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).....	44
9.2 Ensayo de actividad luciferasa.....	45
10. Análisis de expresión de proteínas mediante western blot	46
11. Ensayo de retardo en gel o EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	49
11.1 Fraccionamiento subcelular	49

11.2 Ensayo de retardo en gel o EMSA.....	50
12. Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia (IF). Análisis multiespectral	51
13. Modelos animales	53
13.1 Líneas de ratones utilizadas	53
13.2 Genotipaje de las colonias utilizadas	55
13.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de colas de ratón.....	55
13.2.2 PCR para genotipado de los ratones	56
13.3 Mantenimiento de las colonias experimentales.....	56
13.4 Ensayos carcinogénicos	57
13.4.1 Tratamiento con 4-Hidroxitamoxifeno	57
13.4.2 Inducción química de tumores de piel de ratón.....	58
13.4.3 Tratamiento agudo con DMBA y TPA de la piel de ratones adultos.....	58
13.4.4 Tratamiento con DMBA y TPA de piel de ratón para el estudio de la expresión de quinasas	58
13.5 Necropsia y procesamiento de pieles	59
13.6 Inclusión de muestras en parafina	59
13.7 Tinción con hematoxilina-eosina	60
13.8 Tinción de LacZ con X-Gal.....	60
13.9 Análisis patológico	61
13.10 Extracción de epidermis a partir de piel de ratón	61
14. Análisis estadístico	61
15. Consideraciones éticas	61
RESULTADOS.....	63
1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN RESPUESTA A DIFERENTES AGENTES ANTITUMORALES	65
1.1 Expresión de la proteína MKP1 en células MEFs derivadas de ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	65
1.2 Supervivencia celular de MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ en respuesta a diferentes agentes antitumorales	66
1.3 Activación de las vías de las MAPKs en respuesta a diferentes agentes quimioterapéuticos en MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	67

1.3.1 Rutas de muerte celular activadas por distintos agentes quimioterapéuticos en MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	67
1.3.2 Rutas de supervivencia celular activadas por distintos agentes quimioterapéuticos en MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	69
2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL CARBOPLATINO EN CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN.....	71
2.1 Supervivencia celular y apoptosis inducida por carboplatino en líneas celulares de CNMP	71
2.2 Rutas de muerte y supervivencia celular activadas por carboplatino en líneas celulares de CNMP	73
2.2.1 Activación de las vías de las MAPKs en respuesta a tratamiento con carboplatino en células de CNMP	73
2.2.2 Quinasas implicadas en la activación de JNK1/2 y p38 por carboplatino en CNMP	75
2.2.3 Activación de NF κ B por carboplatino en células de CNMP.....	77
3. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES CON EXPRESIÓN INDUCIBLES DEL ONCOGÉN K-Ras.....	86
3.1 Estudio del papel de MKP1 en la aparición y desarrollo de tumores de pulmón en ratones K-ras ^{+V12} ; RERT ^{+/ert} ; $mkp1^{-/-}$	86
3.2 Análisis inmunohistoquímico de los patrones de expresión asociados a la ausencia de MKP1 en las lesiones pulmonares inducidas por el oncogén K-Ras.....	91
3.3 Estudio del mecanismo molecular responsable de la carcinogénesis de pulmón inducida por MKP1 y el oncogén K-Ras ⁻	93
4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PIEL EN RATONES DEFICIENTES EN MKP1 Y EN TUMORES HUMANOS.....	97
4.1 Estudio del papel de MKP1 en la aparición y desarrollo de tumores de piel en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	97
4.2 Relación entre la expresión de MKP1 y la proliferación y/o diferenciación de las células epidermales	102

4.2.1 Análisis de la expresión de quinasas y marcadores de diferenciación epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	102
4.2.1.1 Análisis de la expresión de quinasas de la familia MAPK en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	102
4.2.1.2 Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación de queratinocitos en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	103
4.2.2 Estudio del efecto del tratamiento con DMBA o TPA sobre la proliferación celular e hiperplasia epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$	105
4.3 Estudio del mecanismo molecular responsable de la carcinogénesis inducida por DMBA-TPA en ratones $mkp1^{-/-}$	108
4.4 Estudio de los niveles de expresión de MKP1 en biopsias de pacientes con cáncer de piel.....	113
DISCUSIÓN	115
1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN RESPUESTA A DIFERENTES AGENTES ANTITUMORALES	117
2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL CARBOPLATINO EN CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN.....	118
3. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES QUE TIENEN EL ONCOGÉN K-Ras ACTIVADO	121
4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PIEL EN RATONES DEFICIENTES EN MKP1 Y EN TUMORES HUMANOS.....	125
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXOS	157
ANEXO I: Eventos de difusión	159
ANEXO II: Publicaciones	169

Abreviaturas

ABREVIATURAS

- **ABSF:** Aminoetilbencenosulfonilo
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **AJCC:** Comité Conjunto Americano de Cáncer
- **AKT:** Homólogo al oncogén viral de timoma murino
- **AP-1:** Proteína activadora 1
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ASK1:** Quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1
- **ATCC:** *American Type Culture Collection*
- **ATF2:** Factor de transcripción activador 2
- **ATG:** Codón de inicio de la traducción (adenosina-timidina-guanosina)
- **ATP:** Adenosina trifosfato
- **BCC:** Carcinoma basal o basocelular (basal cell carcinoma)
- **Bcl-2:** Linfoma de célula B tipo 2
- **BSA:** Albúmina sérica bovina
- **BMC:** Bleomicina
- **BrdUrd:** 5-Bromo-2'-deoxiuridina
- **CC10:** Marcador específico de células bronquiales de tipo Clara
- **CDC42:** Proteína de ciclo de división celular 42
- **CDDP:** cis-Platino
- **CBDCA:** Carboplatino
- **CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- **CHOP-1:** Proteína homóloga a C/EBP
- **CK10:** Citoqueratina 10
- **CMP:** Cáncer microcítico de pulmón
- **CMV:** Citomegalovirus
- **CNMP:** Cáncer no microcítico de pulmón
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2

- **CRE-ERT2:** Recombinasa Cre fusionada a un dominio de unión al ligando de estrógeno (ERT2) mutante
- **DAB:** Diaminobenzidina
- **DAPI:** 4,6-Diamino-2-fenil-indol
- **DMBA:** 7,12-Dimetilbenzantraceno
- **DMEM:** Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **DOC:** Deoxicolato sódico
- **DOXO:** Doxorrubicina
- **DTT:** Ditiotreitól
- **DUSP:** Fosfatasa de especificidad dual
- **ECL:** Enhanced Chemoluminescence
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético
- **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- **EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético
- **ELK1:** Gen 1 homólogo a Ets
- **EMSA:** Ensayo de retraso en la movilidad electroforética en gel
- **ERBB-1:** Homólogo al oncogén viral de leucemia eritoblástica
- **ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares
- **ETOP:** Etopósido
- **EUROCare:** EUROpean CAncer REgistry-based study on survival and CARE of cancer patients
- **FBS:** Suero fetal bovino
- **5-FU:** 5-Fluorouracilo
- **GPCR:** Receptor acoplado a la proteína G
- **H&E:** Hematoxilina y eosina
- **H-Ras:** Gen Harvey-Ras
- **HEK:** Fibroblastos embrionarios de riñón humano
- **Hepes:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
- **HT:** Heterocigoto

- **IASLC:** Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón
- **IC₅₀:** Concentración a la que se produce la mitad de la máxima inhibición
- **IF:** Inmunofluorescencia
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **IκB:** Proteína inhibitoria de κB
- **IKK:** Quinasa de IκB
- **INE:** Instituto Nacional de Estadística
- **IP:** Ioduro de propidio
- **IRES-β-geo:** Intraribosomal entry site- β-galactosidase-neomycin resistance
- **JNK:** Quinasa del dominio N-terminal de c-Jun
- **K10:** Citoqueratina 10
- **kb:** Kilobase
- **KI:** Knock-in
- **KO:** Knock-out
- **K-Ras:** Homólogo al oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2
- **LacZ:** Gen que codifica la β-Galactosidasa
- **LOH:** Pérdida de heterocigosidad
- **LoxP:** Sitio de 34 pb en el bacteriófago P1 (locus of X-over P1)
- **MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- **MAPKAPK:** MAPK activada por quinasa
- **MAPKK:** MAPK quinasa
- **MAPKKK:** MAPKK quinasa
- **MAPKKKK:** MAPKKK quinasa
- **Mb:** Mega base
- **MEFs:** Fibroblastos embrionarios murinos
- **MEF-2:** Factor potenciador específico de miocito 2
- **MEK:** MAP quinasa de ERK
- **MKK:** MAP quinasa de JNK o p38
- **MKP:** Fosfatasa de MAPK
- **MKP1:** Fosfatasa de MAPK Tipo I
- **MNK1/2:** Quinasas 1 y 2 relacionadas con la señal de MAPK

- **MSK:** Quinasa activada por MAPK/SAPK
- **Myc:** Gen de la mielocitomatosis celular
- **NSCLC:** Cáncer no microcítico de pulmón
- **NF-κB:** Factor Nuclear-κB
- **4-OHT:** 4-Hidroxitamoxifeno
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OXALI-Pt:** Oxaliplatino
- **p16:** Inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina
- **PAGE-SDS:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras de SDS
- **PARP:** Polimerasa Poly (ADP-ribosa)
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **pb:** Pares de bases
- **PCR:** Reacción en cadena de la ADN polimerasa
- **PI3K:** Fosfoinosítido 3 quinasa
- **PKC:** Proteína quinasa C
- **PLA2:** Fosfolipasa A2
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **poli-A:** Secuencia larga de poliadenilato situada unos 20-30 nucleótidos antes del extremo 3' original del ARNm
- **Q-RT-PCR:** Reacción en cadena de la ADN polimerasa cuantitativa a tiempo real
- **RB:** Retinoblastoma
- **RERT^{+/ert}:** Cepa murina que expresa la recombinasa inducible Cre-ERT2 bajo el control del locus que codifica la subunidad grande de la ARN polimerasa II
- **rpm:** Revoluciones por minuto
- **RPMI:** Instituto Memorial *Roswell Park*
- **RSK:** Quinasa ribosomal S6
- **RT-PCR:** Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la ADN polimerasa
- **RTK:** Receptor tirosina quinasa
- **SCC:** Carcinoma de célula escamosa (squamous cell carcinoma)
- **SpCC:** Carcinoma fusocelular

- **SPC:** Marcador específico de neumocitos tipo II
- **S.D:** Desviación estándar
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- **SPRPs:** Proteínas pequeñas ricas en prolina (small proline-rich proteins, SPRPs)
- **Stat3:** Transductor de la señal y activador de la transcripción 3
- **TBS:** Solución Tris-salina
- **TGF- α :** Factor de crecimiento transformante α
- **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β
- **TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral α
- **TNM:** Tumor-Nódulo-Metástasis
- **TPA:** 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato
- **TRAF:** Factor asociado al receptor TNF
- **T-TBS:** Solución Tris-salino con Tween-20
- **UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer
- **UTR:** Región no traducida
- **UV-C:** Ultravioleta C
- **VINC:** Vincristina
- **WB:** Western blot
- **WT:** Wild type
- **X-Gal:** 5-Bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactósido

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. El cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según el Informe Mundial de Cáncer publicado a finales de 2008 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad ha supuesto 7,6 millones de muertes en 2008, esto es, alrededor del 13% de todas las defunciones mundiales (2) y se pronosticó que estas cifras continuarían aumentando, estimando que en el año 2010 el cáncer sería la primera causa de muerte en el mundo, por delante de las enfermedades cardiovasculares. Los principales tipos de tumores que lideran la mortalidad general anual por cáncer son: pulmón, estómago, colon, hígado y mama. Concretamente en España, datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) destacan que en el año 2008, el 26,9% de las muertes fueron causadas por la enfermedad del cáncer, suponiendo la principal causa de muerte por debajo de los 80 años de edad.

Desde el punto de vista genético, el cáncer es una enfermedad que implica una serie de cambios dinámicos en el genoma. Así, se han descubierto mutaciones que activan oncogenes, los cuales presentan una ganancia aberrante de su función; y mutaciones que inactivan genes supresores tumorales, que presentan una pérdida recesiva de su función. El desarrollo de un tumor sigue un proceso en el que la acumulación de alteraciones genéticas, cada una de las cuales confiere uno o varios tipos de ventaja en el crecimiento, dan lugar a una conversión progresiva de una célula normal a una cancerosa, pasando por situaciones intermedias de célula pre-cancerosa. Revisando las principales causas moleculares que desembocan en el desarrollo del cáncer, en el año 2000 Hanahan y Weinberg describieron que la gran mayoría de los tipos humanos de cáncer comparten un pequeño número de aspectos moleculares, bioquímicos y celulares (115), basándose en que las células cancerígenas presentan defectos en los circuitos de regulación que gobiernan la proliferación celular y la homeóstasis. Por tanto, estos autores sugirieron que el fenotipo de célula cancerígena se manifiesta por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que conjuntamente dan lugar a un crecimiento maligno y que son: capacidad de proliferar de una manera independiente de señales mitogénicas, insensibilidad a la señalización antiproliferativa, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y por último, invasión de tejidos circundantes y capacidad de diseminación y metástasis. Los notables avances en la investigación del cáncer de la última década, han llevado a estos autores a proponer dos nuevas alteraciones esenciales para el desarrollo de un tumor: la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular con el fin de sustentar de una manera más eficaz la proliferación neoplásica; y la capacidad de las células tumorales de evadir la destrucción inmunológica, principalmente, por los linfocitos T y B, macrófagos y las células asesinas naturales (natural killer cells) (116).

2. Cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo produciendo 1,4 millones de fallecimientos al año, siendo en hombres la primera causa de muerte por cáncer (22,3% del total de fallecimientos por tumores malignos) y la segunda en mujeres, tras el cáncer de mama (11,3% del total de muertes por cáncer) (2). Según el EUROCare 4, en España fallecen unas 18.000 personas al año a causa del cáncer de pulmón, unos 16.000 hombres (el 27% de todas las muertes por tumores malignos), y unas 2.000 mujeres (el 6% de las muertes por cáncer) (1). Así, la mortalidad por este tipo de tumores en España, comparada con el resto del mundo, se puede considerar alta para el sexo masculino, siendo la primera causa de muerte por cáncer en el hombre, seguido del cáncer colorrectal y el de próstata. En cambio, en el sexo femenino la mortalidad es de las más bajas del mundo, representando sólo el sexto puesto como causa de mortalidad por cáncer.

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se origina a partir de un crecimiento desordenado, anárquico y agresivo de estructuras broncopulmonares. Inicialmente, el tumor es asintomático y se produce un crecimiento progresivo del mismo invadiendo otras estructuras del pulmón o de la vecindad como la pleura, los músculos, los ganglios, el corazón, etc. Es, por lo tanto, un tumor localmente muy agresivo, que puede producir a menudo metástasis a distancia. Es frecuente, en el cáncer de pulmón, que estas metástasis a distancia se produzcan en huesos, cerebro, hígado y piel, aunque es posible que aparezcan en cualquier otro órgano.

2.1. Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón.

La clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón se basa en técnicas histológicas y patológicas. La última clasificación histológica del cáncer de pulmón propiciada por la OMS y por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) en 1999, divide el cáncer de pulmón principalmente en dos grandes grupos:

1) **Carcinomas de células pequeñas o microcíticos (CMP)**: formados por células pequeñas con escaso citoplasma, límites celulares mal definidos, cromatina finamente granular y nucléolos inconspicuos o invisibles. Las células son redondeadas, ovales o fusiformes con moldeamiento nuclear y muestran gránulos de neurosecreción en su citoplasma. Además, presentan abundante necrosis y una alta tasa mitótica. Los tumores de células pequeñas representan alrededor del 20% de todos los tumores de pulmón diagnosticados (116). Suelen tener una localización peribronquial y un alto porcentaje de metástasis en el momento del diagnóstico. Estos tumores presentan una evolución clínica muy agresiva, síndromes paraneoplásicos y suelen ser sensibles a quimioterapia y radiación (47, 53, 281).

2) **Carcinomas de células no pequeñas o no microcíticos (CNMP)**: compuestos por células de un tamaño mayor, con abundancia de citoplasma, presencia de nucléolos y no muestran gránulos de neurosecreción. El cáncer no microcítico de pulmón representa el 80% de este tipo de cáncer y suele tratarse con cirugía. Los tumores no microcíticos se dividen en tres

grandes grupos: el carcinoma escamoso o epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes. El carcinoma epidermoide representa aproximadamente el 30% de todos los tumores de pulmón diagnosticados. Dos terceras partes suelen tener una localización central, mientras la otra tercera parte suele tener una localización periférica. El adenocarcinoma de pulmón también representa el 30% de todos los cánceres de pulmón diagnosticados, siendo heterogéneo desde el punto de vista histológico y presentando normalmente dos o más subtipos histológicos. Finalmente, el carcinoma de células grandes representa el 9% de todos los tumores de pulmón. Estos tumores suelen tener una localización periférica, aunque también pueden presentar una localización central (281, 315).

2.2. Tratamiento del cáncer de pulmón.

Las medidas terapéuticas tradicionales para el tratamiento del cáncer de pulmón incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de éstas. En la actualidad, otras técnicas como la terapia biológica o inmunoterapia están en fase de experimentación y plantean prometedoras perspectivas (183). La elección del tratamiento en el cáncer de pulmón va a depender en un primer momento de la clasificación anatomopatológica del tumor y del estadio de la enfermedad. La cirugía, sola o combinada con otras terapias, se indica cuando se prevé que todo el tejido tumoral pueda ser extirpado y que el paciente pueda soportar la cirugía y no quede, tras la misma, con una calidad de vida muy deficiente. La radioterapia se administra sobre el tumor original con intentos de control de la enfermedad, sola o asociada a otras terapias. Finalmente, la quimioterapia, aplicada de modo principal o junto a la cirugía y radiación en la denominada terapia combinada, se utiliza para controlar la enfermedad local (el tumor inicial) y las metástasis (80, 213).

El CNMP en estadios I y II son considerados tradicionalmente como “enfermedad localizada” y por lo tanto candidatos a resección quirúrgica. Sin embargo, la mayoría de este tipo de tumores están localmente avanzados (estadios IIIa y IIIb) o diseminados (IV), por lo que son considerados como “irresecables” en el momento del diagnóstico y por tanto, tratados habitualmente mediante radioterapia y/o quimioterapia (134).

Una de las principales limitaciones en el tratamiento del cáncer de pulmón es la resistencia que presentan estos tumores a la quimioterapia. Los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes a la quimioterapia antes del tratamiento, lo que se conoce como resistencia intrínseca, o bien pueden adquirir la resistencia al fármaco durante el tratamiento, lo que se denomina resistencia adquirida (178). Ambos tipos de resistencias limitan la eficacia de los agentes antitumorales utilizados y se cree que son responsables del fallo del tratamiento en aproximadamente el 90% de pacientes con cáncer metastásico (178). La resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia puede deberse a la alteración de diferentes procesos celulares como el transporte del fármaco al citoplasma y/o núcleo, la reparación del ADN o fallos en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (140, 187, 230).

2.3. Agentes antitumorales utilizados en el tratamiento del CNMP: carboplatino y cis-Platino.

Existe multitud de fármacos anticancerosos empleados en la quimioterapia del cáncer de pulmón. Entre ellos, destacan los compuestos derivados de platino, cis-Platino y carboplatino, que se caracterizan generalmente por su actuación interfiriendo la síntesis de *ADN*. El cis-Platino (CDDP) es el principal agente quimioterápico utilizado en el tratamiento del CNMP avanzado seguido del carboplatino (CBDCA) (164). La respuesta inicial al tratamiento con CDDP es muy alta, pero la mayoría de pacientes con cáncer de pulmón finalmente recaen debido a la adquisición de resistencia y a la alta toxicidad generada por el fármaco. Así, de la búsqueda de un compuesto menos tóxico que el CDDP surgió el CBDCA. El CBDCA difiere químicamente del CDDP en los grupos donantes (ligandos salientes), que en el caso del CDDP son dos átomos de cloro mientras que en el CBDCA es un ciclobutanodicarboxilato que forma una estructura de anillo. Esta diferencia en su estructura química es determinante en su papel como agente quimioterápico ya que por ejemplo, hace que sea más estable en sangre que el CDDP. Por el contrario, el resto de la estructura química es idéntica entre ambos fármacos, y esta similitud hace que su mecanismo de acción molecular sea muy parecido. Así, una vez dentro de la célula el CBDCA o CDDP sufren una reacción de hidrólisis que permite su interacción con el ADN dando lugar a la formación de unos compuestos de coordinación platino-ADN. Las principales uniones platino-ADN que se forman son las uniones entre dos guaninas adyacentes o 1,2-d(GG) intracatenarias, y con menor incidencia las uniones entre dos guaninas no adyacentes o 1,3d(GNG), uniones entre una adenina y una guanina adyacentes o 1,2d(AG), y uniones entre dos guaninas de diferentes hebras o intercatenarias (227). Estas uniones platino-ADN producen una curvatura de la molécula de ADN que impide el acceso y acción de la ADN polimerasa, bloqueando así la replicación y transcripción de distintos genes, resultando en la muerte de las células cancerosas (187). Una de las principales ventajas clínicas que presenta el CBDCA respecto al CDDP es que a dosis efectiva, el CBDCA es menos nefrotóxico, ototóxico y neurotóxico que el CDDP, lo que unido a su gran facilidad de administración hace que el CBDCA esté reemplazando lentamente el uso del CDDP en el tratamiento de ciertos tumores y en situaciones donde la toxicidad es un factor crucial.

2.4. Biología molecular del cáncer de pulmón.

En los últimos años se han hecho grandes avances en el entendimiento de los mecanismos moleculares que desencadenan el desarrollo del cáncer de pulmón. La carcinogénesis pulmonar se inicia y progresa principalmente debido a la acumulación de alteraciones genéticas que dan como resultado la activación aberrante de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales que son claves en rutas de señalización fundamentales para la transformación tumoral (101). Las alteraciones moleculares en las células neoplásicas suponen la adquisición de nuevas

características que les confieren mayor agresividad, resistencia al tratamiento y/o capacidad de invasión y metástasis.

2.4.1. Activación de oncogenes en el desarrollo de cáncer de pulmón.

Durante el desarrollo del cáncer de pulmón se produce la activación de oncogenes que codifican por proteínas que favorecen la progresión tumoral. Entre los oncogenes mejor estudiados se encuentra ERBB-1, también conocido como EGFR, que se expresa en la mayoría de los CNMP y se asocia a mal pronóstico (91, 265). Sin embargo, también aparecen mutaciones en este gen que hacen que el tumor sea sensible a inhibidores de la actividad quinasa del receptor, como gefitinib (268). Entre un 20 y un 30% de todos los CNMP tienen el gen K-Ras mutado, y en un porcentaje similar, en adenocarcinomas pulmonares (234). Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión de la proteína Myc tiene lugar en un 10% de CNMP (198), y que la proteína Bcl-2 se expresa en un 10% de adenocarcinomas pulmonares (232). También aparecen otros genes mutados como son la quinasa ALK (54), PI3K/AKT (267) y RAF/MEK/ERK (236).

2.4.2. Inactivación de genes supresores tumorales en el desarrollo de cáncer de pulmón.

El silenciamiento de genes supresores tumorales es una de las alteraciones moleculares que predominan en la carcinogénesis de pulmón. Los mecanismos de silenciamiento génico más frecuentes para este tipo tumoral son las mutaciones y deleciones cromosómicas, estas últimas suelen ocurrir en la mayoría de los casos por pérdida de un alelo y posible mutación del otro, lo que se conoce como LOH (Loss of heterocigosity) es decir, pérdida de la heterocigosidad (301). En los últimos años, el silenciamiento transcripcional epigenético ha sido propuesto como otro método de inactivación, el cual cada vez va adquiriendo mayor importancia (120). Los genes supresores tumorales mejor estudiados son retinoblastoma (RB), p16 y sobre todo p53. El gen p53 codifica una proteína imprescindible para mantener la integridad genómica. Mutaciones en este gen están presentes en un 75% de los casos de CNMP (42, 279). También se ha descrito que entre un 30% y un 50% de CNMP no expresan p16 debido a deleciones génicas, mutaciones puntuales o hipermetilación del promotor del gen (90), y que el gen RB está inactivado en el 30% de CNMP, correlacionándose con el estadio (20% en estadio I y II y 60% en estadios III-IV) (76, 231).

2.5. Modelos murinos en cáncer de pulmón.

Los tumores de pulmón espontáneos desarrollados en ratones son similares en morfología, histopatología y características moleculares a los adenocarcinomas humanos. Por tanto, los modelos murinos de cáncer de pulmón pueden servir como una valiosa herramienta no sólo en el entendimiento de la biología básica de esta enfermedad, sino también en la identificación de marcadores para un diagnóstico temprano. Para cumplir con estos objetivos, los distintos modelos murinos de cáncer de pulmón deben parecerse a los diferentes tipos de tumores

humanos pulmonares con respecto a las alteraciones genéticas y a las características fundamentales de las células tumorales (65, 88, 246).

Se han descrito una gran variedad de modelos de ratón de cáncer de pulmón. Éstos incluyen modelos espontáneos de cáncer de pulmón de ratón como se observa en las cepas sensibles, modelos en los que los tumores son inducidos por agentes carcinógenos, y los modelos modificados genéticamente en los que los tumores de pulmón surgen como resultado de la introducción de diferentes lesiones genéticas. Este último enfoque ha sido recientemente mejorado por la generación de cepas de ratones que portan oncogenes condicionales y genes supresores de tumores, que permite la inducción de estas mutaciones somáticas de una manera locotemporal, de tal modo que imitan muy de cerca el carácter esporádico del cáncer de pulmón humano.

2.5.1. Modelos transgénicos murinos en cáncer de pulmón.

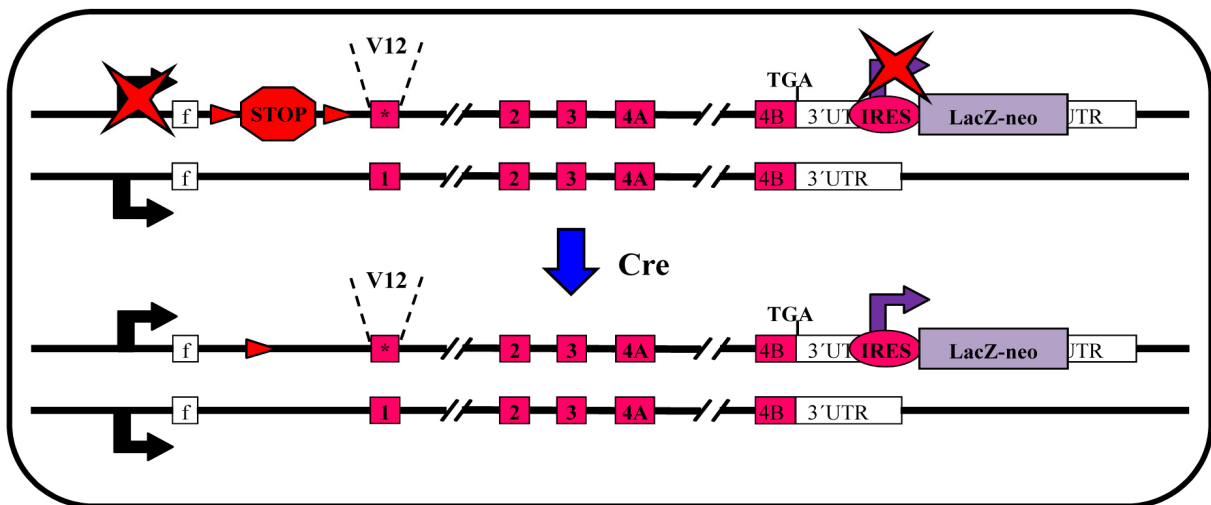
La introducción de las lesiones genéticas encontradas en el cáncer de pulmón humano en la línea germinal o el tejido pulmonar del ratón se ha traducido en el desarrollo de tumores de pulmón de ratón que se asemejan en muchos aspectos a los tumores de pulmón en el hombre. Sin embargo, los ratones modificados genéticamente clásicos no reproducen los hechos subyacentes al desarrollo de cáncer esporádico. La expresión generalizada de oncogenes o la ausencia de genes supresores tumorales probablemente crea un microambiente que difiere sustancialmente de aquel en el que se desarrolla el cáncer, en el que sólo un pequeño número de células mutadas están rodeadas por las células normales (135, 194). El uso de alelos condicionales de oncogenes y genes supresores tumorales ha permitido el desarrollo de modelos murinos de cáncer de pulmón que reproducen con mayor fidelidad este proceso tumorogénico esporádico. En los modelos condicionales de cáncer de pulmón, sólo un subconjunto de células adquiere mutaciones en un ratón adulto en el que se ha completado el desarrollo pulmonar.

La tecnología Cre/loxP (107, 159) se ha utilizado para desarrollar múltiples alelos condicionales de genes supresores de tumores y oncogenes. Hasta ahora se han generado tres cepas de ratones portadores de alelos condicionales del oncogén K-Ras^{G12D} o K-Ras^{G12V} que contienen un elemento de parada transcripcional floxeado (108, 130, 195). En esta tesis hemos utilizado un modelo murino de cáncer de pulmón basado en la activación sistémica de un alelo condicional K-Ras^{G12V} (108), en el que la activación del oncogén *K-Ras* tiene lugar en un contexto celular que se acerca lo más posible a las condiciones fisiológicas en que tiene lugar la activación de este oncogén *in vivo*. Este modelo porta por un lado un alelo mutado en el codón 12 (V12) del oncogén K-Ras4B, precedido por un casete de parada transcripcional o stop situado justo después del promotor y flanqueado por secuencias LoxP, y seguido de un casete reportero IRES- β -geo (*Intraribosomal entry site- β -galactosidase-neomycin resistance*) en el extremo 3'UTR (*untranslated region*), que permite monitorizar la expresión inducible del oncogén K-Ras por tinción específica de la betagalactosidasa (LacZ) con X-Gal (Figura 1A). Y

por otro lado, porta un casete de la CRE-ERT2 (recombinasa Cre inducible por 4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT) (36)) en el extremo 3'UTR de la ARN polimerasa II (ARN pol II, cuya expresión debe ser universal puesto que suponemos que todas la células tienen que sintetizar ARN), entre el ATG y el poli A (Figura 1B). De este modo y solo cuando se induce con 4-OHT, la proteína CRE-ERT2 puede unirse al transportador nuclear y translocarse al núcleo. Una vez allí reconoce las secuencias LoxP situadas flanqueando el casete stop y las deletiona, permitiendo la expresión del alelo mutado. Así se consigue un modelo murino de expresión condicional del oncogén *K-Ras*^{V12} y monitorizable por tinción de LacZ con X-Gal, dónde por inducción con 4-OHT se puede controlar la activación del alelo *K-Ras*^{V12} en células somáticas. Este modelo se denomina *K-Ras*^{+V12}; *RERT*^{+/ert}.

Se ha descrito que K-Ras es esencial para el desarrollo (133, 154) ya que su ausencia provoca la muerte del animal entre los días 12 y 14 del desarrollo embrionario con un cuadro de anemia e incremento de apoptosis en hígado, corazón y cerebro. Por ello el ratón homocigoto *K-ras*^{V12/V12} no es viable.

A



B

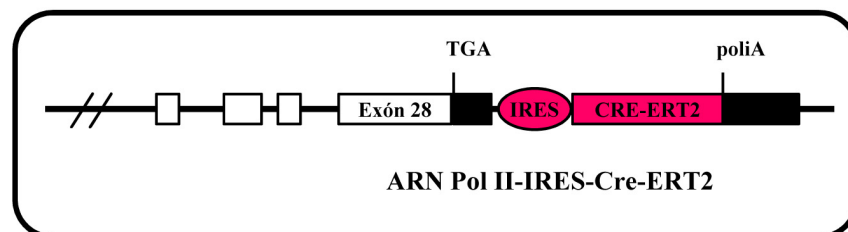


Figura 1: A) Esquema de activación mediante la recombinasa Cre del modelo de ratón de expresión inducible del oncogén *K-Ras* y monitorizable por tinción de LacZ con X-Gal. Las flechas rojas indican las secuencias LoxP. B) Esquema del alelo modificado que da lugar a la transcripción bicistrica del ARN de la ARN pol II y la recombinasa inducible CRE-ERT2.

3. Cáncer de piel.

El cáncer de piel es una enfermedad por la cual se produce un crecimiento de células malignas en este órgano. Los tumores cutáneos son la forma más frecuente de cáncer en la población de piel blanca, superando al cáncer de pulmón, mama, colon y próstata. Las tasas anuales de todas las formas de cáncer de piel están aumentando cada año y se estima que más de 1 millón de nuevos casos ocurren anualmente. El cáncer de piel engloba a un conjunto de enfermedades neoplásicas que tienen características muy diferentes tanto por su diagnóstico, tratamiento y pronóstico como por sus factores de riesgo; lo único que tienen en común es la misma localización anatómica: la piel.

3.1. La piel.

La piel es una barrera fisiológica que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. Está constituida por un tejido adiposo (hipodermis), un tejido conectivo (dermis) y un epitelio (epidermis) (Figura 2).

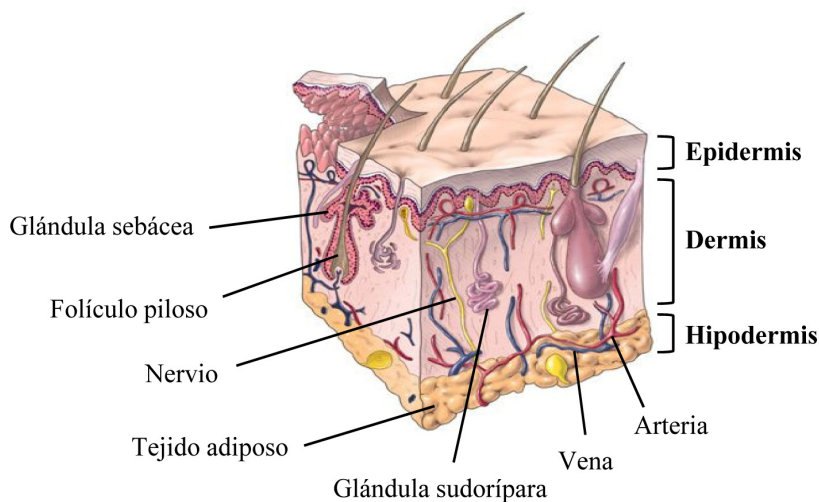


Figura 2: Esquema de la estructura de la piel.

3.1.1. Hipodermis.

La hipodermis, también llamada tejido subcutáneo, es la capa más interna de la piel y une de manera poco firme la dermis con los órganos subyacentes (Figura 2). Está compuesta por tejido conjuntivo laxo y adiposo, lo cual le da a la piel funciones de regulación térmica y protege el cuerpo contra traumatismos superficiales.

3.1.2. Dermis.

La dermis es la capa intermedia y sirve de soporte de varias estructuras anatómicas como vasos sanguíneos, vasos linfáticos, receptores sensoriales, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (Figura 2). La dermis está compuesta principalmente por matriz

extracelular, la cual, a su vez, está constituida por un componente fibroso: colágeno (tipo I, III y en la membrana basal el tipo IV) y elastina, y un componente no fibroso: glicosaminoglicanos y glicoproteínas filamentosas. Las fibras de colágeno y elastina se disponen de forma paralela en esta capa intermedia de la piel, dándole a ésta la consistencia y elasticidad características del órgano.

3.1.3.Epidermis.

La epidermis es la capa más externa y fina de la piel y está compuesta en su mayor parte por queratinocitos. Además, contiene melanocitos (células productoras de melanina, un pigmento de la piel cuya principal función es proteger de los rayos ultravioletas solares), células de Langerhans (macrófagos intraepidérmicos que presentan los antígenos a los linfocitos T) y células de Merkel o mecanorreceptocitos (células que registran el tacto superficial). La epidermis se separa de la dermis gracias a la membrana basal y se compone de 4 ó 5 capas, dependiendo de la región de la piel. La **capa basal o germinal** es la capa más profunda que se encuentra en la epidermis y es en la única donde hay presencia de melanocitos. Está formada por solo una hilera de queratinocitos que están en constante división celular y es la única capa en la que los queratinocitos tienen capacidad proliferativa. A continuación se encuentran la **capa espinosa**, constituida por varias capas de queratinocitos que no poseen capacidad de dividirse, la **capa granular**, formada por células que contienen gránulos de queratohialina (sustancia precursora de la queratina) y que están dedicadas exclusivamente a la síntesis de queratina; y la **capa translúcida**, que solo está presente en la piel gruesa (piel labial, plantar y palmar) y está compuesta por unas pocas hileras de queratinocitos completamente infiltrados de queratina y que están muertos. Finalmente, la **capa córnea** constituye la capa más gruesa y superficial de la epidermis. Está constituida por capas de células muertas denominadas corneocitos que constituyen el estadio final de la evolución de los queratinocitos. Se encuentra en constante descamación, aunque en condiciones normales este fenómeno es imperceptible (Figura 3) (185).

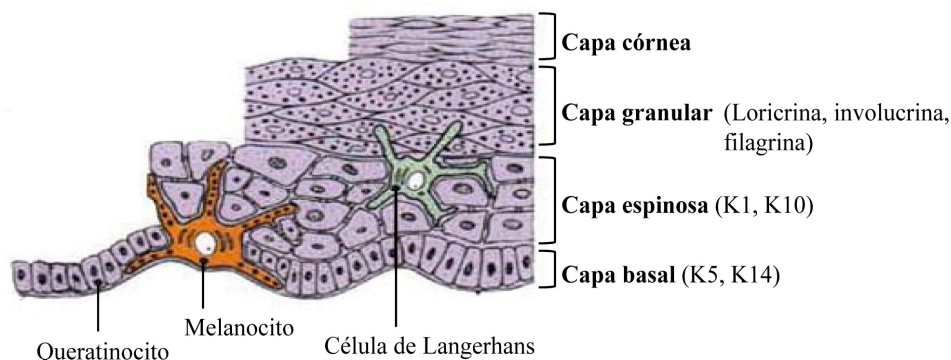


Figura 3: Estructura de la epidermis donde se muestra la expresión de marcadores de diferenciación de cada capa de la epidermis. K, queratina.

Estas cinco capas de la epidermis constituyen el llamado proceso de queratinización o diferenciación terminal de los queratinocitos que da lugar a la formación de la barrera epidermal (capa córnea) de la piel. A lo largo de las diferentes etapas de la diferenciación terminal, distintas proteínas son expresadas por las células epidermales. Los queratinocitos proliferantes de la capa basal expresan predominantemente las queratinas K5 y K14. Bajo un complejo control transcripcional que implica varias vías de señalización celular, la mayoría de los queratinocitos pierden su capacidad de proliferar y adherirse a la membrana basal y posteriormente entran en el proceso de diferenciación terminal. Al llegar a la capa espinosa comienzan a expresar proteínas requeridas para la queratinización como las queratinas K1 y K10. Tras atravesar la capa espinosa, las células llegan a la capa granular donde adquieren gránulos de queratohialina que contienen predominantemente profilagrina, la proteína precursora de la filagrina. En esta etapa también se expresan proteínas estructurales adicionales entre las que se encuentran la loricrina, involucrina, trichohialina y proteínas pequeñas ricas en prolina (small proline-rich proteins, SPRPs). Posteriormente, las proteínas epidermales se unen entre sí por transglutaminasas, estableciendo la envoltura cornea, una envoltura proteica gruesa periférica que estabiliza a cada corneocito. Finalmente, se sintetizan lípidos que se distribuyen por el espacio extracelular reforzando la barrera epidermal (Figura 3) (157, 303).

En individuos sanos, existe un balance preciso entre la proliferación de las células basales y la descamación de la capa córnea. Este proceso está rigurosamente organizado, en el espacio y el tiempo, y alteraciones en él pueden dar lugar a varias enfermedades de piel, como la dermatitis por contacto, ictiosis, psoriasis y dermatitis atópica, o cáncer. Por lo tanto, las principales vías de señalización implicadas en la homeostasis epidermal deben ser estrictamente controladas.

3.2. Tipos de cáncer de piel.

Se distinguen dos grandes grupos de cáncer de piel: el cáncer cutáneo no melanoma y el grupo melanoma maligno.

3.2.1. Cáncer de piel no melanoma.

Es el tipo más frecuente y se denomina así porque se forma a partir de otras células de la piel que no son los melanocitos. Abarca fundamentalmente el carcinoma basal o basocelular (BCC, basal cell carcinoma), el carcinoma de célula escamosa (SCC, squamous cell carcinoma) y otras neoplasias que son de muy baja frecuencia comparadas con las anteriores.

3.2.1.1. Carcinoma de Célula Basal (BCC).

El BCC es la forma más común de cáncer de piel, alrededor del 75% de todos los tumores cancerosos cutáneos son de este tipo, pero es el menos peligroso ya que casi nunca se extiende a otras partes del cuerpo (metástasis). Tiene su origen en las células basales de la capa más profunda de la epidermis, su localización es preferentemente centrofacial y es causado por daños directos en el ADN.

3.2.1.2. Carcinoma de Célula Escamosa (SCC).

El SCC es la segunda forma más común de cáncer cutáneo, representa alrededor del 20% de todos los casos de cáncer de piel, y se origina en las células escamosas que componen la capa más externa de la epidermis. No es muy peligroso ya que la mayoría de los SCC, 97%, son localizados pero el pequeño porcentaje restante puede establecer metástasis en ganglios regionales y otros órganos. Predomina en partes expuestas a la luz solar, principalmente en cabeza y extremidades, y es causado por daño directo en el ADN. Los SCCs se pueden clasificar en distintos tipos (del I al IV) dependiendo de su grado de diferenciación histológica. Los carcinomas bien diferenciados (SCC I y II) son histológicamente similares a los papilomas, siendo fácilmente diferenciadas la capa basal, la suprabasal y el estroma. Los carcinomas pobremente diferenciados (SCC III) son mas invasivos, poseen una organización estructural pobre aunque sus queratinocitos siguen estando polarizados y expresando queratinas (3). Los carcinomas indiferenciados (SCC IV), también denominados carcinomas fusocelulares (SpCC), aparecen muy tarde y con una frecuencia baja (153). Son tumores muy desorganizados, agresivos y metastásicos, que han perdido características epiteliales (E-caderina, K5 y K14), y han adquirido un fenotipo mesenquimático (vimentina, fibronectina, integrina $\alpha_5\beta_1$) (3, 304). Otros tipos de cáncer de piel no melanoma, menos comunes que los anteriores son el sarcoma de Kaposi, linfomas, sarcomas o el carcinoma de células de Merkel.

3.2.2. Melanoma maligno.

Es la forma más peligrosa de cáncer de piel ya que aunque es minoritario, solo representa el 3% de este tipo de cáncer, es el responsable de la mayoría de muertes por cáncer cutáneo debido a que tiende a metastatizar. Este tumor se origina en los melanocitos que se encuentran en la epidermis y es causado por daño indirecto en el ADN.

También existen los tumores benignos de la piel y las enfermedades precancerosas. La mayoría de tumores benignos no son cancerosos, y sólo en contadas ocasiones llegan a convertirse en cáncer. Entre estos tumores se encuentran la mayoría de los tipos de lunares, las queratosis seborreicas, hemangiomas, lipomas y verrugas. Las enfermedades precancerosas en cambio, sí suelen dar lugar a neoplasias cutáneas y entre ellas destacan la queratosis actínica y el carcinoma de células escamosas *in situ* o Enfermedad de Bowen (las células de este cáncer se encuentran completamente dentro de la epidermis, y no se han extendido a la dermis. Es la forma más precoz del cáncer de piel de células escamosas y se manifiesta en forma de manchas rojizas).

3.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de piel.

Después del diagnóstico del cáncer de piel sin presencia de melanoma, se realizan pruebas para determinar si células cancerosas se han diseminado en la piel o a otras partes del cuerpo. La información obtenida a partir de este examen determina el estadio de la enfermedad. En la

séptima edición (2010) del *AJCC Cancer Staging Manual*, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) designó los estadios del cáncer de piel mediante la clasificación TNM, que se usa para estadificar tanto el carcinoma de células basales como el carcinoma de células escamosas. El parámetro T se define por el tamaño tumoral. Tiene cinco sufijos, is y del 1 al 4, que indican de forma progresiva el mayor grado de extensión del tumor primario. El parámetro N define la ausencia o presencia de afectación ganglionar, y esta última tiene tres grados de extensión. Por último, el parámetro M indica la presencia o ausencia de metástasis distantes. Los grupos de TNM de pronóstico parecido se agrupan en cinco estadios (Tabla 1), y el pronóstico de la enfermedad está directamente relacionado con la extensión tumoral, de tal forma que a mayor estadio tumoral peor pronóstico.

Estadio	TNM		
	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IV	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 1. Estadio anatómico/Grupos de pronóstico del cáncer de piel.

La mayoría de los cánceres de piel pueden ser tratados mediante extirpación, asegurándose de que los bordes quedan libres de células tumorales. Estas escisiones ofrecen la mejor cura para la enfermedad temprana y de alto riesgo. Para la enfermedad de bajo riesgo, la radioterapia y la crioterapia (terapia en la que mediante nitrógeno líquido se congelan y destruyen las células cancerosas), pueden proporcionar un control adecuado de la enfermedad, ambas, sin embargo, tienen tasas de curación global menor que la cirugía. Cuando el cáncer se ha diseminado (metástasis), además de los procedimientos quirúrgicos puede ser necesario el uso de quimioterapia.

3.4. Carcinogénesis de piel.

El cáncer de piel progresa a través de etapas morfológica y genéticamente distintas. El modelo de carcinogénesis química de piel de ratón es un protocolo simple, versátil y altamente reproducible que utiliza un iniciador y un promotor tumoral, logrando reproducir un proceso canceroso multisecuencial (Figura 4) (33, 118, 175). A partir de este modelo el desarrollo de tumores cutáneos se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión/conversión.

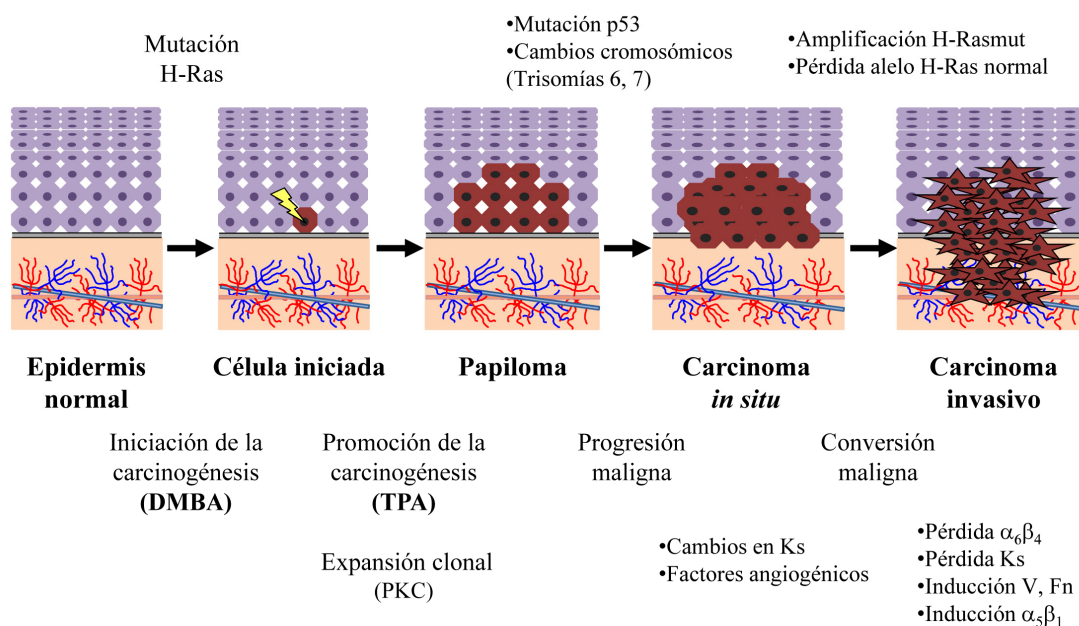


Figura 4: Modelo de carcinogénesis química de piel de ratón inducida por DMBA/TPA. Alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas con las distintas etapas de la carcinogénesis de piel de ratón. Ks, queratinas; V, vimentina; Fn, fibronectina.

3.4.1. INICIACIÓN: Es un proceso mutagénico irreversible que normalmente es causado por daños en el ADN como consecuencia de la exposición a agentes químicos carcinogénicos (303). El agente mutagénico no es capaz de inducir tumores por sí mismo, por lo que el estado iniciado puede persistir a lo largo de toda la vida del animal sin desarrollar tumores a no ser que éste sea expuesto a un agente promotor tumoral. El carcinógeno más comúnmente utilizado es el 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), que actúa provocando una transversión específica A-T en el codón 61 del oncogén Harvey-Ras (H-Ras), lo que resulta en su activación constitutiva (16, 24, 226, 314). El 90% de los tumores iniciados por el carcinógeno DMBA presentan dicha mutación, la cual es específica del agente mutagénico ya que puede ser detectada antes de la aparición de tumores visibles (Figura 4).

3.4.2. PROMOCIÓN: Es necesaria la acción de un promotor tumoral para que las células iniciadas adquieran una ventaja selectiva en relación a las células vecinas normales (304). Por ello, después de la iniciación, se realiza la aplicación repetida de un promotor de tumores, normalmente el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (33, 118,

175). De este modo se inducen en un corto espacio de tiempo (a partir de 8 semanas) lesiones neoplásicas benignas (papilomas), que son heterogéneas ya que unas persisten y otras desaparecen y son reabsorbidas en la piel. El número, tamaño e índice de crecimiento de estos tumores pueden ser fácilmente cuantificados ya que, por ejemplo, es posible realizar múltiples medidas en el mismo ratón a lo largo del tiempo. El TPA, activa a la proteína quinasa C (PKC) (211, 314), aumentando la expresión del factor de crecimiento transformante α (TGF- α) (128, 222), c-jun y c-fos (123, 238), los cuales regulan directamente la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos (305). Además, H-Ras induce la expresión de ciclina D1 (89). Junto con ciclina D1, existen numerosos reguladores y efectores de H-Ras con un papel crucial en la formación y progresión de tumores en este modelo (141). Todos estos cambios favorecen la selección y expansión clonal de los queratinocitos, generando múltiples papilomas benignos, cada uno de los cuales representa un clon expandido de células iniciadas (126, 303) (Figura 4).

3.4.3. PROGRESIÓN/CONVERSIÓN: La progresión de los papilomas a carcinomas es un proceso espontáneo y poco frecuente (303), que puede ser incrementado por la acción de iniciadores tumorales, pero no se ve afectado con el uso de promotores tumorales (119, 212). La mayoría de los papilomas benignos no progresan a carcinomas malignos a lo largo de la vida normal del animal (37, 118, 248). Por lo tanto, la etapa de progresión premaligna es la principal fase dependiente del tiempo en el desarrollo del cáncer cutáneo. Una pequeña población de papilomas (5-10%) progresan a carcinomas escamosos malignos (87, 262) que también pueden ser fácilmente visualizados y cuantificados y presentan una gran variedad de cambios fenotípicos (63, 102, 271); sin embargo, las principales anomalías genéticas que desarrollan son aquellas asociadas con inestabilidades genómicas como la aneuploidia y la inestabilidad cromosómica (63, 102, 271-272). Los papilomas son generalmente diploides (14), sin embargo, estudios genéticos han descrito trisomías en los cromosomas 6 y 7. También se han descrito mutaciones y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en el gen p53 asociadas con esta conversión maligna, las cuales se detectan raramente en papilomas (40, 142, 158). Finalmente, una pequeña fracción de estos carcinomas puede metastatizar a sitios distantes.

Así, el número final de papilomas inducidos por DMBA y TPA puede considerarse como una medida de iniciación, el índice de crecimiento de papilomas como una medida de promoción o expansión clonal de las células iniciadas, la tasa de conversión de papiloma a carcinoma como una medida de evolución a malignidad. Finalmente, se puede medir la metástasis como el último paso de la evolución (141) y conversión maligna, la cual se caracteriza por invasión a través de la membrana basal y migración al estroma subyacente. Este proceso requiere cambios importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz (303) e implica, al menos, una mutación adicional como mutaciones en p53 y upregulación de la familia

de factores de transcripción AP-1 (74) o mutaciones en el gen c-fos (105). Por tanto, en este modelo experimental la evolución fenotípica desde un queratinocito normal a un papiloma escamoso y, finalmente, a un carcinoma escamoso está asociada con cambios genéticos y epigenéticos reproducibles que caracterizan cada etapa del proceso y permiten analizar cada fase de la carcinogénesis cutánea a nivel molecular (Figura 4).

4. Proteínas quinasas activadas por mitógenos: MAPKs.

Con el fin de sobrevivir y llevar a cabo sus funciones, las células deben responder a un gran número de estímulos extracelulares y cambios medioambientales, como mitógenos, hormonas, estrés, cambios de temperatura o presión osmótica. La respuesta de las células a las señales extracelulares a menudo está mediada por la activación de factores de transcripción, que a su vez, inducen los correspondientes procesos celulares. Sin embargo, la mayoría de agentes extracelulares no pueden atravesar la membrana plasmática para activar los genes correspondientes. Por ello, estos agentes utilizan vías de señalización para transmitir sus señales a diferentes dianas citoplasmáticas y nucleares (41, 143). En muchos casos, estas vías actúan a través de fosforilaciones secuenciales en diferentes proteínas que se conocen como cascadas de proteínas quinasas. Este tipo de mecanismo de señalización es el que utilizan las proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPK, que son vías de transducción de señales conservadas evolutivamente. Estas cascadas responden a varios factores extracelulares y, en consecuencia regulan diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación y transformación, respuesta a estrés, inflamación, parada del crecimiento y apoptosis.

Se han descrito 4 cascadas diferentes de MAPKs en mamíferos: las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2; extracellular signal-regulated kinase 1/2) (30), las quinasas c-Jun N-terminal 1, 2 y 3 (JNK1/2/3; c-Jun N-terminal kinase 1/2/3) (69, 163), las proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 α , β , γ (ERK6) y δ (94, 112, 239), y ERK5 (166, 312). Existen también otras MAPKs, ERK3/4 y ERK7/8 (50), pero éstas no llevan a cabo su acción a través de una cascada quinasa, o son activadas por mecanismos diferentes a los de las MAPKs, por lo que no son consideradas como auténticas MAPKs. De todas ellas, las tres vías principales de MAPKs son ERK1/2, JNK1/2 y p38. Cada una de estas cascadas está formada por un modulo de tres niveles de proteínas quinasas denominadas MAPK, MAPK quinasa (MAPKK) y MAPKK quinasa (MAPKKK), y a menudo por dos niveles adicionales, el nivel superior MAPKKK quinasa (MAPKKKK) y el nivel inferior MAPK activada por quinasa (MAPKAPK). Las señales se transmiten a los niveles inferiores de la vía mediante interacciones secuenciales entre los miembros de ésta, en las que la MAPK (ERK1/2, JNK1/2 o p38) es fosforilada de manera dual en los residuos de treonina y tirosina conservados del motivo T-X-Y (Thr-X-Tyr; donde X es cualquier aminoácido) localizado en sus dominios de activación (144, 214, 242). Esta reacción está mediada por una MAPKK dual específica, que a su vez es activada por fosforilación de los residuos serina/treonina en el motivo conservado S/T-X5-S/T (donde X

es cualquier aminoácido) por diferentes MAPKKK (Raf en la activación de ERK1/2, MEKK1 y ASK1 en la de JNK1/2 y ASK1 y MEKK4 en la activación de p38) (144, 214). La MAPK activada se transloca del citoplasma al núcleo donde fosforila y activa a sus principales sustratos, la mayoría, factores de transcripción (143) (Figura 5).

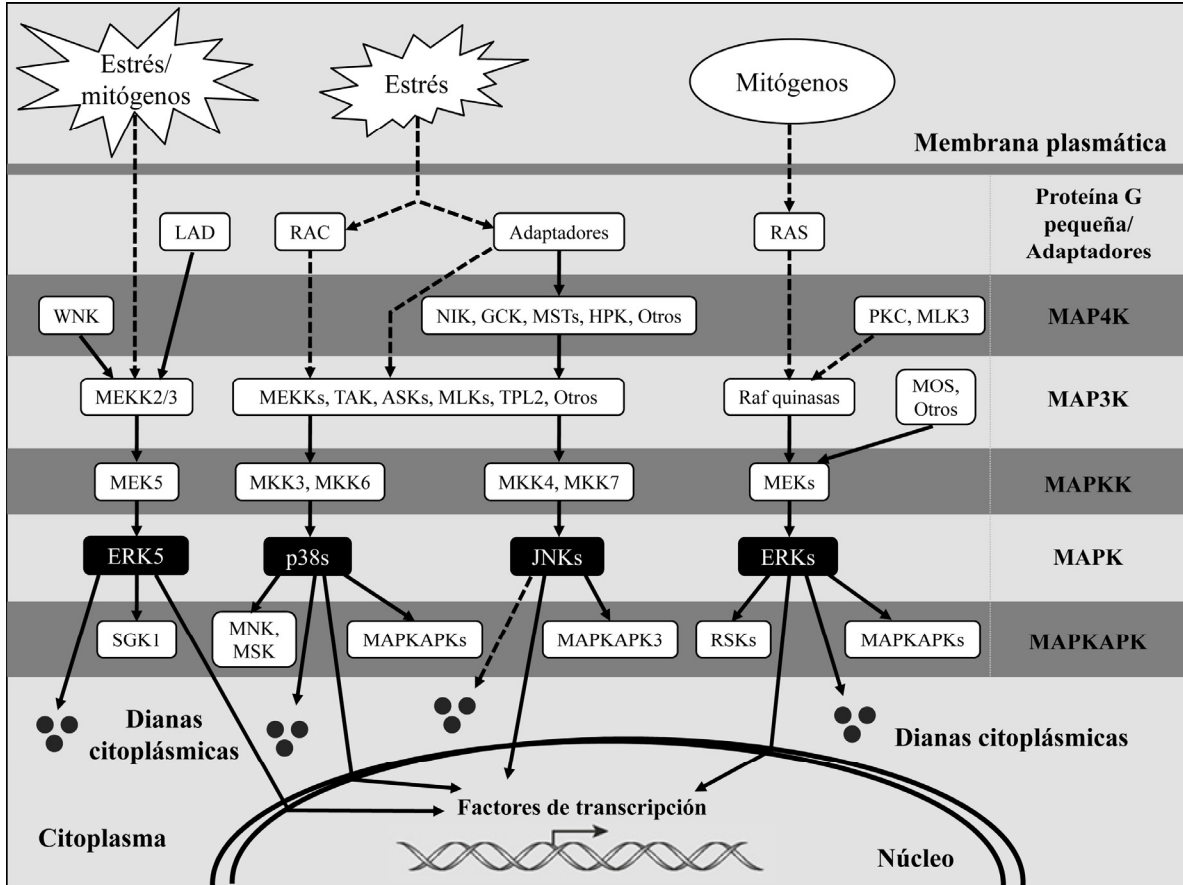


Figura 5: Representación esquemática de las cuatro principales cascadas de señalización MAPK. Adaptado de Keshet et al., 2010.

4.1. Principales vías de señalización de la familia MAPK.

4.1.1. La vía de ERK.

La vía de ERK es activada por varios agentes extracelulares como factores de crecimiento, hormonas y estrés celular para inducir diferentes procesos celulares que incluyen principalmente la proliferación y diferenciación. Sin embargo, dependiendo de las líneas celulares y el estímulo también puede participar en respuesta al estrés y apoptosis (8, 10, 191-192, 276). Las proteínas ERK actúan a través de receptores tirosina quinasa (RTK (186)), receptores acoplados a la proteína G (GPCR (207)), y canales iónicos (228), entre otros. Existen dos genes que codifican las quinasas ERK, ERK1 (MAPK3) y ERK2 (MAPK1), que codifican dos proteínas principales, p44 y p42, respectivamente (30). Su activación tiene lugar a través de las proteínas MAPK/ERK quinasa 1 y 2 (MEK1/2 (52, 311)), mediante la fosforilación de los residuos tirosina y treonina del motivo Thr-Glu-Tyr. ERK1/2 son serin/treonin quinasas que fosforilan cientos de sustratos

en el citosol (como PLA2, RSK), o tras su translocación, en el núcleo (Elk1(300)). La mayoría de los sustratos de ERK1/2 son proteínas reguladoras entre las que se encuentran RSK (ribosomal S6 kinase (264)), MSK (MAPK/SAPK-activated kinase (66)), MNK1/2 (MAPK signal-interacting kinases 1 and 2 (95, 294)), y MAPKAPK3/5 (240), aunque esta última también puede ser activada por p38 (Figura 5).

4.1.2. La vía de p38.

La vía p38 participa principalmente en respuesta de las células a estrés, pero también en otros procesos como respuesta inmune e inflamación (45, 57, 114, 176, 275). La actividad de esta cascada es inducida por diversos factores de estrés y ligandos que operan a través de diferentes receptores, incluyendo los receptores relacionados con apoptosis, GPCRs, y RTKs. Las principales MAPKKs de la vía p38 son MKK6 y MKK3 (55, 70, 113), aunque MKK4 (70) y MKK7 (64) también han sido implicadas en la activación de esta quinasa. Existen cuatro genes que codifican la MAPK p38. Estos son p38 α (MAPK14 (112, 165, 239)), p38 β (MAPK11 (131)), p38 γ (MAPK12) and p38 δ (MAPK13) (103, 170, 193). La activación de estas quinasas tiene lugar por fosforilación de los residuos tirosina y treonina del motivo Thr-Gly-Tyr localizado en su dominio de activación. Una vez que estos p38s son activados, bien transmiten la señal a diversas proteínas quinasas como MNK1/2, MSK1/2, y MK5/PARK (209-210), o bien a diferentes factores de transcripción como ATF2, ELK1, CHOP-1 o MEF-2 entre otros (240). A diferencia de ERK1/2, los p38s se pueden localizar en el núcleo y/o en el citosol, y su translocación tras la estimulación parece ser bidireccional (170) (Figura 5).

4.1.3. La vía de JNK.

Otra cascada de MAPK activada por estrés es la de las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs (28, 71, 132, 291, 296). La vía JNK juega un papel importante en la respuesta a estrés y en la inducción de apoptosis en respuesta a diferentes estímulos, pero también puede participar en otros procesos. Al igual que la vía p38, esta cascada es sensible a los receptores relacionados con estrés, GPCRs y RTKs. Estos receptores pueden activar diferentes proteínas que, a su vez, pueden inducir la activación de proteínas adaptadoras (por ejemplo TRAF (12)) o de GTPasas pequeñas (como Rac o CDC42 (49)). A continuación, las señales son transmitidas a las MAPKKs, que son principalmente MKK4 y MKK7 (124, 244, 278, 280, 299) pero también pueden participar (en un grado mucho menor) MKK3 y MKK6 (70). Tres genes (MAPK8, MAPK9 y MAPK10) codifican las proteínas JNK (JNK1, JNK2 y JNK3, respectivamente (78, 109)). JNK1 y JNK2 se expresan en casi todas las células, mientras que JNK3 se encuentra principalmente en el cerebro (78). La activación de las JNKs tiene lugar por fosforilación de los residuos treonina y tirosina del motivo Thr-Xaa-Tyr (donde Xaa corresponde a Pro) localizado en su dominio de activación. Tras la activación, las JNKs se translocan al núcleo donde activan a sus dianas, que en su mayoría son factores de transcripción como Elk1 o las proteínas AP-1, que incluyen c-jun, junB, junD y ATF-2 (160) (Figura 5).

4.2. Regulación de la activación de las MAPKs.

Cada una de las vías de las MAPKs puede regular varios procesos celulares diferentes e incluso, opuestos; y por lo general, parecen diferir en sus principales actividades fisiológicas. Por ello, el control estricto de la señalización de estas quinasas es determinante para definir el resultado de su activación. Este control depende de factores que afectan a la actividad espacio-temporal de la quinasa (22), influyendo en la magnitud y duración de su activación. Estos factores son diversos y complejos e incluyen la densidad y tasas de internalización de los receptores de superficie celular, la interacción de componentes de la vía MAPK con proteínas adaptadoras y el balance entre la activación de la quinasa y las proteínas fosfatasas que bloquean su señal (22, 202, 205). Aunque las MAPKs son defosforiladas por fosfatasas de amplia especificidad, en los primeros momentos de su activación también son dianas de moléculas inhibitorias específicas, las fosfatasas de MAPK (MKPs; MAP Kinases Phosphatases), que pertenecen a la familia de fosfatasas de especificidad dual (DUSPs; Dual-Specificity Phosphatase). Esta última clase de proteínas desempeñan un papel importante en la regulación de la señalización de las MAPKs (145, 247), el cual se discutirá más adelante.

4.3. MAPKs y cáncer.

Como se ha comentado anteriormente, la tumorigénesis requiere la desregulación de al menos los seis procesos celulares descritos por Hanahan y Weinberg (115-116), a los que además podemos añadir, adquisición de resistencia a los medicamentos y evasión de oncogenes que promueven senescencia. Anomalías en la señalización de las MAPKs afectan a la mayoría, si no a todos estos procesos, y juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer (34, 77, 96, 155, 277). Se han detectado alteraciones en la señalización de las MAPKs en distintos cánceres humanos, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares por los que estas proteínas señalizadoras controlan la formación de tumores es esencial en la búsqueda de nuevas estrategias que permitan diseñar terapias más efectivas en el futuro.

5. Proteínas fosfatasas de MAPK: MKPs.

Las fosfatasas de MAPK (MKPs) son miembros de la familia de fosfatasas de especificidad dual (DUSPs), que a su vez forman parte del gran y diverso grupo de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) (5, 72, 156, 214, 273). Muchas MKPs son inducidas como genes tempranos en respuesta a la activación de la vía de las MAPKs y actúan como inhibidores negativos endógenos de su señalización (298). Las MKPs regulan la actividad de la vía de las MAPKs mediante defosforilación simultánea de los residuos de serina/treonina y residuos tirosina que se encuentran en el motivo de activación TXY (Thr-Xaa-Tyr) presente en los miembros de la familia de las MAPKs (270, 298). La estructura de las MKPs es conservada y se caracteriza por la presencia de un dominio catalítico C-terminal y un dominio no catalítico N-terminal (72, 146). A pesar de su estructura común, estas fosfatasas tienen propiedades específicas relativas a sus sustratos y localización subcelular. La especificidad de las MKPs hacia una u otra MAPK

reside en unas secuencias de su dominio N-terminal, conocidas como motivo de interacción quinasa (KIM; Kinase Interaction Motif). La familia MKP está formada por 11 miembros que de acuerdo a su similitud de secuencia, localización celular y especificidad de sustrato se dividen en tres grupos (72, 156, 214, 273, 298):

1. MKPs nucleares inducibles: lo forman DUSP1/MKP1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP2 y DUSP5/hVH-3. Todas ellas son proteínas nucleares, rápidamente inducibles por estímulos mitogénicos y/o estrés y con especificidad hacia ERK1/2, JNK1/2 y p38, excepto DUSP5 que presenta especificidad exclusivamente hacia ERK1/2.
2. MKPs citoplásmicas con especificidad hacia ERK1/2: está constituido por DUSP6/MKP3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP4 que son proteínas citoplasmáticas que inactivan específicamente a ERK1/2.
3. MKPs que inactivan a JNK1/2 y p38: este grupo comprende DUSP8/hVH-5, DUSP10/MKP5 y DUSP16/MKP7, las cuales se encuentran tanto en núcleo como en citoplasma y defosforilan selectivamente a JNK1/2 y p38. A este grupo pertenece también STYXL1/MK-STYX, una fosfatasa catalíticamente inactiva (32).

5.1. MKP1

MKP1/DUSP1 (MAP-Kinase-Phosphatase Type I/ Dual-Specificity-Phosphatase Type I) fue la primera MKP descrita y se descubrió como un gen de expresión temprana. Se expresa de manera ubicua en los tejidos humanos, y su expresión génica es rápidamente inducida en una amplia variedad de tipos celulares por diferentes estímulos y agentes que dañan las células, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, estrés oxidativo y osmótico, hipoxia y agentes que dañan el ADN (32, 144, 168). Además de su actividad como MAPK fosfatasa, MKP1/DUSP1 también defosforila la histona H3 en el residuo pSer10 (152), aunque aún no se ha determinado la relación entre esta actividad H3-fosfatasa y cáncer.

5.1.1. MKP1 y cáncer.

Puesto que MKP1 controla la actividad de las MAPK y estas juegan un papel importante en cáncer, es lógico pensar que esta fosfatasa puede tener un papel crítico en la inducción y progresión tumoral. Se ha descrito que la expresión de MKP1 está alterada en cáncer de colon, próstata, vejiga, ovario, mama y CNMP (144, 298). Muchos tumores expresan altos niveles de MKP1 pero este aumento es a menudo específico para ciertas etapas de la carcinogénesis. En los tumores epiteliales humanos como el de próstata, colon y vejiga, MKP1 está sobreexpresado en las primeras etapas de la enfermedad y disminuye gradualmente conforme avanza la progresión tumoral (144, 174, 309). Por ejemplo, la expresión de MKP1 aumenta en la hiperplasia benigna de próstata y la neoplasia intraepitelial de próstata de alto grado, pero su expresión se pierde en las últimas etapas de este cáncer (174, 229). Los niveles elevados de MKP1 en el cáncer de próstata humano se correlacionan con una disminución en la apoptosis (182).

MKP1 también está regulada por hipoxia, una característica de muchos tumores (35) y se incrementa en etapas invasivas de ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha detectado un aumento en la expresión de MKP1 en el 60% de los carcinomas de ovario invasivo (67). MKP1 también se expresa más específicamente en las etapas poco diferenciadas y finales del cáncer de mama (174), donde se correlaciona con una actividad reducida de JNK1/2 y con la activación de caspasas y fragmentación del ADN (259). Asimismo, MKP1 presenta altos niveles de expresión en líneas celulares de CNMP (48) y está relacionada con la inducción de angiogénesis y metástasis en este tipo de tumor (201). Sin embargo, cabe señalar que en otros tipos de tumores, como el carcinoma hepatocelular o testicular, MKP1 puede tener un papel contrario en la progresión tumoral, ya que su expresión está disminuida en lugar de aumentada (206, 218, 282). Esta aparente discrepancia probablemente sea debida a las diferentes vías de las MAPKs inactivadas por MKP1 en los distintos tipos tumorales.

Varios trabajos han atribuido un papel importante a MKP1 en resistencia a la quimioterapia. Se ha visto una relación entre sobreexpresión de MKP1 y resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario (290), pulmón (293) y mama (259). Por tanto, es posible que la inhibición de la expresión de MKP1 sea una nueva forma de combatir la resistencia a quimioterapia.

6. El factor de transcripción NFκB.

El factor de transcripción NFκB (nuclear factor-κB), es un factor dimérico que puede estar formado por combinaciones de cinco subunidades diferentes: p65/RelA, c-Rel, RelB, p105-p50/NFκB1 y p100-p52/NFκB2 (19, 99, 269). En respuesta a diferentes estímulos, controla la expresión de genes que regulan el ciclo celular, respuesta inmune, angiogénesis, adhesión celular y apoptosis (19, 117, 269). La activación de los dímeros puede tener lugar por dos vías de señalización: la vía canónica, en la que la activación de NFκB depende de la actividad del complejo IKK (formado por las subunidades IKKα, IKKβ e IKKγ/NEMO), que tras ser activado por diferentes estímulos fosforila la proteína inhibitoria IκB favoreciendo su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma. Esto permite la liberación y posterior translocación a núcleo del dímero p65-p50. Esta vía está relacionada principalmente con inflamación, proliferación celular y señales de supervivencia. La vía no canónica requiere la activación de dímeros IKKα por la proteína quinasa NIK. Esta vía se caracteriza por la ausencia de subunidades p65 y la presencia de heterodímeros p52-RelB y participa principalmente en diferenciación celular e inmunidad humoral (19, 136, 203, 269). Además de su papel en carcinogénesis, NFκB juega un papel importante en quimioresistencia ya que se ha observado que varios agentes quimioterápicos, como el CDDP, activan la vía NFκB e inducen la expresión de genes antiapoptóticos limitando así la actividad antitumoral de éstos (13, 39, 269).

Objetivos

OBJETIVOS

- 1. Estudio de la función de MKP1 en respuesta a diferentes agentes antitumorales.**
- 2. Caracterización del mecanismo de acción antitumoral del carboplatino en carcinoma no microcítico de pulmón.**
- 3. Estudio del papel de MKP1 en la tumorigénesis y progresión del cáncer de pulmón en ratones con expresión inducible del oncogén K-Ras.**
- 4. Determinación de la función de MKP1 en la tumorigénesis y progresión del cáncer de piel en ratones deficientes en MKP1 y en tumores humanos.**

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y agentes quimioterápicos.

Los diferentes reactivos biológicos y fármacos utilizados en esta memoria, así como su abreviatura, concentración de trabajo y procedencia, se detallan en la Tabla 1.

Fármaco	Abreviatura	Concentración de trabajo	Proveedor
cis-Platino	CDDP	20 µg/ml	Ferrer Farma
Carboplatino	CBDCA	600 µg/ml	Bristol-Myers
Oxaliplatino	OXALI-Pt	20 µg/ml	Sanofi-Aventis
Etopósido	ETOP	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
Doxorrubicina	DOXO	0,2 µM	Sigma-Aldrich
Bleomicina	BMC	0,1 U/ml	Almirall
Ultravioleta-C	UV-C	40 J/cm ²	-----
Vincristina	VINC	0,1 µg/ml	Cinfa
Taxol	TAXOL	10 µM	Sigma-Aldrich
5-FluoroUracilo	5-FU	200 µg/ml	Roche
4-Hidroxitamoxifeno	4-OHT	500 µg/ratón	Sigma-Aldrich
7,12-Dimetilbenzantraceno	DMBA	32 µg/ratón	Sigma-Aldrich
13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol	TPA	12,5 µg/ratón	Sigma-Aldrich
5-Bromo-2'-deoxiuridina	BrdUrd	150 mg/kg peso ratón	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Características de los agentes quimioterápicos utilizados. µg/ml: microgramos/mililitro; µM: microMolar; U/ml: unidades/mililitro; J/cm²: julios/centímetro cuadrado; µg/ratón: microgramos/ratón; mg/kg peso ratón: miligramos/kilogramo de peso del ratón.

2. Plásmidos y cepas bacterianas.

Los plásmidos empleados en esta memoria, así como su procedencia, se recogen en la Tabla 2.

Todos los plásmidos utilizados en esta tesis se propagaron en la cepa E.coli DH5α y se crecieron en medio LB a 37°C, con agitación constante, durante 16 horas.

Plásmido	Comentario	Procedencia
pMEKK1		Dr. Michael Karin
pMEKK1(K-R)	Mutante dominante negativo de la quinasa MEKK1	Dr. Michael Karin
pSEK1		Dr. Michael Karin
pSEK1(K-R)	Mutante dominante negativo de la quinasa SEK1	Dr. Michael Karin
pMKK7		Dr. Silvio Gutkind
pMKK7(K-L)	Mutante dominante negativo de la quinasa MKK7	Dr. Silvio Gutkind
pMKK3		Dr. Silvio Gutkind
pMKK3(A-L)	Mutante dominante negativo de la quinasa MKK3	Dr. Silvio Gutkind
pMKK6		Dr. Silvio Gutkind
pASK1		Dr. Silvio Gutkind
pIKK α		Dr. Michael Karin
pIKK α AA	Mutante dominante negativo de la quinasa IKK α	Dr. Michael Karin
pIKK β		Dr. Michael Karin
pIKK β AA	Mutante dominante negativo de la quinasa IKK β	Dr. Michael Karin
HIV-Luc	Gen reportero que contiene los dos sitios de unión κ B del promotor HIV seguidos de un casete de expresión de luciferasa	Dr. Michael Karin
RC-CMV-IkB α -Ala32/Ala36 (IkB α -SR)	Plásmido represor de la proteína IkB α que porta mutaciones en las dos serinas 32/36	Dr. Whiteside
Gal4-Luc	Gen reportero que contiene las secuencias que codifican el dominio de unión al ADN de Gal4 seguidos de un casete de expresión de luciferasa	Dr. Lienhard Schmitz
Gal4-p65TAD1	Plásmido en el que las secuencias que codifican el dominio de unión al ADN de Gal4 están unidas a las secuencias que codifican el dominio de transactivación 1 (TAD1) de p65	Dr. Lienhard Schmitz

Tabla 2. Características de los plásmidos utilizados.

3. Líneas celulares, cultivo y conservación de las líneas celulares.

Las diferentes líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, así como el tipo celular que representan, su origen y medio de cultivo empleado, se especifican en la Tabla 3.

Línea celular	Tipo celular	Origen	Medio de cultivo	Proveedor
Humanas				
H23	Carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP)	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-5800)
H460	Carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP)	Derrame pleural de un carcinoma de pulmón	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (HTB-177)
H1299	Carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP)	Nódulo linfático de un carcinoma de pulmón	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-5803)
HEK 293T	Línea celular normal	Células epiteliales de riñón embrionario humano	DMEM+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-11268)
Ratón				
MEFs mkp1^{+/+}	Fibroblastos embrionarios murinos	Embriones murinos mkp1 ^{+/+}	DMEM+10% FBS (G/F/G)*	Nuestro laboratorio
MEFs mkp1^{-/-}	Fibroblastos embrionarios murinos	Embriones murinos mkp1 ^{-/-}	DMEM+10% FBS (G/F/G)*	Nuestro laboratorio

Tabla 3. Características de las líneas celulares utilizadas. (G/F/G): Medio suplementado con 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona y 40 µg/ml de gentamicina; (G/F/G)*: Medio suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 2 mM de glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 40 µg/ml de gentamicina, 0,5 µmol/L (v/v) de β-mercaptoetanol y 0,5 µg/ml de fungizona; ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

Las líneas celulares H23, H460 y H1299 se cultivaron en medio RPMI (*Instituto Memorial Roswell Park*) y el resto de líneas celulares en DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco) (ambos procedentes de Gibco). Ambos medios de cultivo se suplementaron con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona y 40 µg/ml de gentamicina, lo que denominamos medio completo. El medio de cultivo utilizado para cultivar las líneas celulares MEFs se suplementaron además con 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales y 0,5 µmol/L (v/v) de β-mercaptoetanol (todos estos reactivos procedentes de Gibco). Las células se crecieron en placas de 10 cm o frascos de 75 cm² y se subcultivaron 1:3-1:6 cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Sigma). Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de

CO₂. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Class II Biohazard Safety Cabinet, ESCO).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4. Generación de fibroblastos embrionarios murinos y condiciones de cultivo.

Los fibroblastos embrionarios murinos (MEF) se generaron a partir de embriones de ratones hembras *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}* en día 13,5 post-concepción (E13,5). En una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad, se sacrificó a la hembra preñada en el día 13,5 de gestación y se extrajo el útero materno con todos los embriones en su interior. Se lavó el útero en una solución de fosfato salino (PBS) y fungizona precalentado a 37°C, y se procedió a la separación de cada uno de los embriones del saco vitelino, eliminándose los órganos diferenciados (cabeza y tejidos rojos) que se utilizaron para su genotipaje. El resto de cada embrión se recogió individualmente en placas de 60-mm y fue sometido a una primera disgregación mecánica con la ayuda de un bisturí estéril, y a continuación a una disgregación enzimática por tratamiento de cada embrión con 1 ml de solución de tripsina-EDTA 2X (diluida de una solución stock 10X, Gibco), durante 20 minutos a 37°C en un incubador de CO₂. Transcurrido este tiempo, se disgregó la suspensión celular pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur y se dejó en el incubador otros 20 minutos más. Posteriormente, se añadió 10 ml de medio completo, con ayuda de la pipeta se terminó con la disgregación mecánicamente y se pasó toda la solución con las células disgregadas a un frasco de 75-cm². Se incubaron las células a 37°C, al día siguiente se cambió el medio y se dejaron crecer hasta confluencia. Cuando el cultivo alcanzó el 70% de confluencia (2-3 días después) las células se tripsinizaron, se transfirieron a un frasco de 150 cm² y se incubaron a 37°C hasta confluencia. En este momento, se congelaron 3-4 millones de células por vial en una cámara de isopropanol a -80°C y una vez congeladas, los viales se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido. Se consideró pase 1 de estas células el momento en que fueron puestas en cultivo después de la descongelación.

Estas células primarias fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 2 mM de glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 40 µg/ml de gentamicina, 0,5 µmol/L (v/v) de β-mercaptoetanol y 0,5 µg/ml de fungizona (todos estos reactivos procedentes de Gibco) a 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂.

5. Tratamientos de líneas celulares y de MEFs.

Para los experimentos realizados con líneas celulares, se sembraron 2×10^6 células H23 y $1,5 \times 10^6$ células H460 y H1299 en placas de 10cm y 24 horas después, cuando las células alcanzaban una confluencia de 70-80%, se les añadió medio fresco en bajo suero (medio completo con 0,5% FBS). Al día siguiente se trataron las células con 600 $\mu\text{g/ml}$ de CBDCA o 20 $\mu\text{g/ml}$ de CDDP durante 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 24 y 36 horas. Inmediatamente después del tratamiento, se extrajo proteína total como se indica en el apartado 10.

Para los experimentos realizados con fibroblastos embrionarios murinos, se sembraron 5×10^5 células MEF $\text{mkp1}^{+/+}$ y MEF $\text{mkp1}^{-/-}$ en placas de 60mm y 24 horas después, cuando las células alcanzaban una confluencia de 70-80%, se les añadió medio fresco bajo en suero. Al día siguiente se trataron las células con los siguientes fármacos durante los periodos de tiempo indicados en la Tabla 4:

Fármaco	Concentración de trabajo	Tiempo de tratamiento (horas)
CBDCA	600 $\mu\text{g/ml}$	1, 2, 4, 8 y 24
CDDP	20 $\mu\text{g/ml}$	3, 6, 12, y 24
OXALI-Pt	20 $\mu\text{g/ml}$	3, 6, 12, y 24
ETOP	10 $\mu\text{g/ml}$	1/2, 1, 2, 4, 8 y 24
DOXO	0,2 μM	1/2, 1, 2, 4, 8 y 24
BMC	0,1 U/ml	1/2, 1, 2, 4, 8 y 24
UV-C	40 J/cm^2	1/2, 1, 2, 3 y 6
VINC	0,1 $\mu\text{g/ml}$	1/2, 1, 2, 4, 8 y 24
TAXOL	10 μM	1, 2, 5, 10 y 24
5-FU	200 $\mu\text{g/ml}$	5, 10, 24, 30, 36 y 48

Tabla 4. Tratamientos de células MEFs. $\mu\text{g/ml}$: microgramos/mililitro; μM : microMolar; U/ml: unidades/mililitro; J/cm^2 : julios/centímetro cuadrado.

Inmediatamente después del tratamiento, se extrajo proteína total como se indica en el apartado 10.

6. Transfección de células.

6.1. Transfección por precipitación con fosfato cálcico.

Se sembraron $7,5 \times 10^5$ células 293T en placas de 60mm quedando a un 60-70% de confluencia. Entre 2 y 4 horas antes de la transfección se cambió el medio a las células, añadiendo 3 ml de medio fresco completo. En un tubo de 5 ml se mezclaron 2,5, 5 o 10 μg del ADN correspondiente con el tampón A y cloroquina. A esta mezcla se le añadieron 500 μl del tampón B y la mezcla final se añadió sobre el cultivo celular gota a gota por toda la placa. Las células se incubaron durante 5-16 horas a 37°C y se lavaron con PBS. A continuación se les

añadió medio fresco en bajo suero, se incubaron durante 12-16 horas a 37°C y se trataron con CBDCA (600 µg /ml) durante 15 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la extracción de proteínas como se indica en el apartado 10.

Tampón A: 62,5 µl de CaCl₂ 2 M, 2 µl de ADN de esperma de salmón (que actúa como ADN carrier) y 435,5 µl de agua Mili-Q estéril.

Tampón B: 11,25 µl de Na₂HPO₄ 1,5 mM pH 7,0 y 488,75 µl HN.

6.2. Transfección transitoria mediante Lipofectamina 2000.

Se sembraron 3x10⁵ células H23, H460 y H1299 en placas de 35mm quedando a un 60-70% de confluencia. Transcurridas 24 horas se realizaron las transfecciones usando el reactivo lipídico Lipofectamina2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ADN plasmídico total se mantuvo constante a 1 µg por placa y una relación ADN:lipido de 1:3 y 1:10 para ADN y Renilla. A las 5 horas posteriores a la transfección se retiró el medio de las células y se añadió medio fresco en bajo suero. Al día siguiente las células se trataron con CBDCA (600 µg /ml) durante 12 horas y transcurrido este tiempo se realizó la extracción de proteínas como se indica en el apartado 10.

7. Ensayo de viabilidad celular mediante la técnica cristal violeta.

La viabilidad celular se estudió mediante curvas de respuesta a diferentes dosis de los fármacos indicados utilizando la técnica de tinción cristal violeta. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (40.000 células/pocillo) y tras 24 horas de cultivo en medio normal, las células se trataron con diferentes dosis de los fármacos indicados. A las 72 horas del tratamiento se fijaron las células con 1% de glutaraldehído y se lavaron con PBS. A continuación las células se tiñeron con 0,1% de colorante cristal violeta durante 30 minutos y el colorante asociado a las células se desprendió con una solución de ácido acético al 10%. Se cuantificó el número de células teñidas leyendo la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Elissa (Molecular devices versamax tunable microplate reader). La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de células teñidas en cada dosis con respecto a las células sin tratamiento, representándose la media de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado con sus correspondientes desviaciones estándar.

8. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo con ioduro de propidio (IP), un agente intercalante que produce fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que contiene la célula.

Las células fueron cultivadas en placas de 10 cm. Transcurridos los tiempos de tratamiento con CBDCA, las células, tanto control como tratadas, se lavaron en PBS, se recogieron mediante tripsinización (tripsina/EDTA, GIBCO) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% en PBS 1X, añadido lentamente con agitación suave. Esta suspensión se incubó a 4°C durante toda la noche para fijar las células. A continuación, se realizó un lavado con 10 ml de PBS centrifugando la mezcla a 1000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 500 µl de PBS. Se añadieron 5 µl de RNAsa 10mg/ml (Qiagen Ltd, Crawley, UK) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se diluyeron las células en 400 µl de PBS y se añadieron 400 µl de una mezcla compuesta por yoduro de propidio 50 µg/ml y citrato sódico 4 mM, justo en el momento de pasar la muestra. El contenido de ADN se estimó analizando la fluorescencia emitida por las células en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson S.A). Se adquirieron 10.000 eventos por cada condición experimental y la población fue analizada usando el programa de análisis Cell Quest Pro 2.0 (Becton Dickinson S.A).

9. Medida de expresión génica.

9.1. Expresión de genes mediante Q-RT-PCR

9.1.1. Muestras de pacientes.

En esta memoria se han utilizado un total de 31 biopsias de piel, de las cuales 10 no presentan alteraciones (piel histológicamente normal procedente de piezas de reducción mamaria), 12 corresponden a carcinomas basocelulares (BCC) y 9 son carcinomas escamosos (SCC), procedentes de pacientes que se sometieron a cirugía en el Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid en el año 2010. Las muestras se recogieron de forma rutinaria y se congelaron a -80°C inmediatamente después de su extracción. El Departamento de Patología del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid examinó y determinó las características histopatológicas de cada muestra, las cuales fueron reexaminadas por un patólogo experimentado para confirmar el diagnóstico.

9.1.2. Extracción de ARN total procedente de tejido humano.

Para la extracción del ARN total de las muestras clínicas, se partió de 5 secciones de 15 µm por pieza de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina. Los cortes fueron desparafinados con xilol, deshidratados en etanol 100% y digeridos con Proteinasa K. A continuación, la extracción del ARN se realizó con el kit comercial RNeasy FFPE kit (Quiagen, Hilden, Germany).

La cuantificación y determinación de la integridad del ARN total aislado se estimaron a partir de una alícuota mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. La

evaluación por espectrofotometría se llevó a cabo con 1 µl de muestra, midiendo la absorbancia a 260 y 280nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND2000. A partir de estos valores, se determinó el ratio de contaminación proteica y la concentración de ARN en µg/µl. Para todas las muestras, los valores de los ratios se situaron dentro del rango óptimo (1.8-2.1). La evaluación por electroforesis se realizó cargando entre 0.5 y 1 µg del ARN total obtenido con tampón de carga en geles de agarosa (1% p/v) preparados en solución TAE. Estos geles se corrieron a 4°C durante 15 minutos a 80 voltios, y posteriormente, fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su visualización con UVA en el transiluminador Gel-Doc 700 (Bio-Rad).

9.1.3. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).

Para la obtención del ADN complementario de cadena simple (ADNc), se retro-transcribió el ARN total procedente de los tejidos de muestras de pacientes usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems-ABI). Esta reacción se realizó utilizando cebadores de secuencia aleatoria (random hexamers, Applied Biosystems-ABI) en un volumen total de 20 µl e incubando la mezcla a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 segundos.

Para determinar la expresión de *mkp1* se utilizó la tecnología reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR). Cada ADNc se analizó por triplicado utilizando el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems-ABI). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl que contenía 6.75 µl de solución de ADNc (correspondiente a 25 ng de ARN total), 7.5 µl de la mezcla TaqMan Gen Expression Master Mix (Applied Biosystems-ABI) y 0.75 µl de la sonda TaqMan Gen Expression Assay (Applied Biosystems-ABI) de cada uno de los genes humanos indicados en la Tabla 5.

Gen	Sonda
Gen diana	
<i>mkp1</i>	Hs00610256_g1
Gen control interno	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Hs00266705_g1
Proteína de unión a la caja TATA (TBP)	Hs00427621_m1
Proteína ribosomal grande P0 (RPLP0)	Hs00420895_gH
Complejo succinato deshidrogenasa, subunidad A (SDHA)	Hs00188166_m1

Tabla 5. Sondas utilizadas en las reacciones de Q-RT-PCR.

Como genes control interno adicionales se incluyeron el ARN ribosomal 18S y la β-actina. En estos casos, los cebadores y las sondas específicas fueron seleccionados, sintetizados y mezclados como se ha descrito anteriormente (7, 20). En todos los casos, las combinaciones

fueron seleccionadas para generar amplicones de un tamaño igual o superior a 75 pares de bases.

El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; y la posterior hibridación y polimerización que se produjeron a 60 °C durante 1 minuto.

La cuantificación relativa de la expresión de los genes se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (173) (Boletín del usuario N° 2 de Applied Biosystems (P/N 4303859)) que consiste en calcular la expresión normalizada del gen de estudio en la muestra problema con respecto a la expresión normalizada del mismo gen en la muestra de referencia. Los datos se presentan como el “cambio en veces de expresión” del gen diana normalizado con un gen de referencia y relativo a una muestra control. Se obtuvieron los valores de umbral de ciclo (Cycle threshold; Ct) para cada gen control en cada muestra y se transformaron en cantidades por el método comparativo Ct. A partir de estos nuevos valores y utilizando el programa de análisis geNorm (284) se seleccionaron los genes control más estables y se calculó un factor de normalización que se usó para obtener los niveles de expresión normalizados de *mkp1*. Estos valores fueron adicionalmente normalizados respecto al nivel de expresión de *mkp1* en la muestra NS 01 (piel normal 01; normal skin 01) al que se le asignó el valor de 1.

9.2. Ensayo de actividad luciferasa.

La regulación transcripcional del factor de transcripción NFκB se cuantificó mediante la medida de la actividad del gen reportero luciferasa precedido de una secuencia del promotor HIV que contiene 4 elementos de respuesta a NFκB (219). La activación transcripcional de la subunidad p65 del factor de transcripción NFκB se midió mediante el sistema formado por el plásmido Gal4-p65 que posee el dominio de transactivación de p65 fusionado al dominio de unión al ADN de Gal4, y el plásmido Gal4-Luciferasa, que posee el gen reportero precedido de la secuencia promotora de Gal4. De esta manera, la cotransfección de ambos plásmidos sólo estimula la expresión de luciferasa si el híbrido Gal4-p65 es fosforilado.

Después de tratar las células con CBDCA (600 µg /ml) durante 12 horas, se lisaron con el tampón comercial Passive Lysis Buffer (Promega). Los lisados celulares se recogieron mediante raspado en hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Con 10 µg de proteína del sobrenadante se cuantificó la actividad luciferasa utilizando los reactivos LAR II y Stop & Glo del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), según las instrucciones del manual usando un luminómetro Berthold. Como control de transfección, se cotransfectó con una construcción del promotor de CMV seguido del gen renilla. La actividad luciferasa se expresó por microgramo de proteína y se normalizó con la luminiscencia de la renilla en el mismo extracto. En las gráficas se muestra la actividad relativa de luciferasa considerándose 1

los niveles de actividad luciferasa detectados con la transfección del vector que contiene sólo el gen reportero luciferasa.

10. Análisis de expresión de proteínas mediante western blot.

Para la extracción de proteína total procedente de líneas celulares, las células tratadas en las diferentes condiciones se lavaron 2 veces con PBS y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis. Se recogieron los lisados mediante raspado en hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El contenido de proteína total de los extractos se evaluó por el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albumina sérica bovina (BSA).

Para la extracción de proteína total de la epidermis procedente de pieles de ratones, se partió de 50-100 mg de tejido congelado a -80°C obtenido como se indica en el apartado 13.10, se añadió un volumen apropiado de tampón de lisis sobre el fragmento de epidermis y se homogenizó por rozamiento en hielo con un poltrón. Se recogieron las muestras homogenizadas y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido sin disgregar. El contenido de proteína total de los extractos se evaluó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control BSA.

Tampón de lisis: 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 25 mM HEPES pH 7,5, 20 mM β-Glicerofosfato, 0,1% TritonX-100, conteniendo los inhibidores de proteasas y fosfatasa fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo (ABSF) 100 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, ortovanadato sódico (Na₃VO₄) 100 mM y ditiotreitól (DTT) 0,5 mM (todos procedentes de Sigma).

El análisis de expresión de proteínas endógenas así como los cambios en la fosforilación de proteínas endógenas se llevó a cabo mediante la técnica de western blot. Después de determinar la cantidad de proteína apropiada, tanto si procedía de las líneas celulares como de las pieles extraídas de los ratones, las muestras se disolvieron en tampón de carga y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. 20 µg del extracto proteico total se analizaron por separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS (con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar del 8, 10 o 15% (BioRad)) en tampón de electroforesis. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo (300 mA, 90 minutos en tampón de transferencia) y se comprobó la transferencia de las proteínas a la membrana con Rojo Ponceau S (Sigma). Las membranas se bloquearon en 5% leche desnatada (Fluka) o 5% BSA (Sigma) disuelto en tampón de tratamiento de membrana durante 60 minutos y se incubaron con el anticuerpo

primario durante 1 hora a temperatura ambiente o 15 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los inmunocomplejos se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) como se indica en el manual de instrucciones. Se retiró el anticuerpo primario de las membranas mediante tratamiento con un tampón de lavado de anticuerpos durante 25 minutos a 65°C y se reincubaron las membranas con diferentes anticuerpos primarios. Los niveles de proteína se relativizaron a la intensidad del control de carga utilizado en cada caso, α -Tubulina o α -actina.

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como su origen, clonalidad, aplicación y procedencia se detallan en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

Anticuerpo	Especie	Clonalidad	Aplicación	Proveedor
MKP-1	Conejo	Policlonal	WB (L.C/M)	Santa Cruz Biotechnology
p-JNK	Conejo	Policlonal	WB (L.C/M)	Promega
JNK1	Conejo	Policlonal	WB (L.C)	Santa Cruz Biotechnology
p-p38	Conejo	Policlonal	WB (L.C/M)	Cell Signaling (#9211)
p38	Conejo	Policlonal	WB (L.C)	Santa Cruz Biotechnology
p-ERK1/2	Ratón	Monoclonal	WB (L.C/M/E.E)	Cell Signaling
ERK2	Cabra	Policlonal	WB (L.C/E.E)	Santa Cruz Biotechnology
PARP-1/2	Conejo	Policlonal	WB (L.C)	Santa Cruz Biotechnology
Caspasa-3	Conejo	Policlonal	WB (L.C/M)	Cell Signaling
α-tubulina	Ratón	Monoclonal	WB (L.C/M)	Sigma, MO, USA
SAPK/JNK	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Cell Signaling (#9252)
p-p38	Conejo	Monoclonal	WB (E.E)	Cell Signaling (#4631)
p38α	Conejo	Monoclonal	WB (E.E)	Cell Signaling (#2371)
p-Stat3	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Cell Signaling
p-p53	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Cell Signaling
p53	Conejo	Policlonal	WB (E.E)/IHQ	Leica Microsystems
p-SEK1/MKK4	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	New England BioLabs Inc.
MEK-4	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Santa Cruz Biotechnology
p-MKK3/MKK6	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Cell Signaling
MKK6	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Cell Signaling
α-actina	Conejo	Policlonal	WB (E.E)	Sigma, MO, USA
p65	Ratón	Monoclonal	IF	Santa Cruz Biotechnology
RelB	Conejo	Policlonal	IF	Santa Cruz Biotechnology
BrdUrd	Ratón	Monoclonal	IHQ	Roche Applied Science
Loricrina	Conejo	Policlonal	IHQ	Santa Cruz Biotechnology
Citoqueratina 10	Conejo	Policlonal	IHQ	Abcam
Involucrina	Conejo	Policlonal	IHQ	LifeSpan BioSciences
p-Stat3	Conejo	Monoclonal	IHQ	Cell Signaling (#9145)
SPC	Conejo	Policlonal	IHQ	Millipore (AB3786)
CC10	Cabra	Policlonal	IHQ	Santa Cruz Biotechnology
ERK	Conejo	Policlonal	IHQ	Cell Signaling (#9101)
Ki67	Conejo	Monoclonal	IHQ	Master Diagnostica
Caspasa3	Conejo	Policlonal	IHQ	R&D Systems

Tabla 6. Características de los anticuerpos primarios utilizados. WB: western blot; IF: Inmunofluorescencia; IHQ: Inmunohistoquímica; (L.C): Línea celular; (M): MEF; (E.E): Extracto epidérmico.

Anticuerpo	Especie	Clonalidad	Aplicación	Proveedor
Donkey Anti-Goat IgG-HRP	Mono	Policlonal	WB (L.C/M/E.E)	Santa Cruz Biotechnology
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Cabra	Policlonal	WB (L.C/M/E.E)	Santa Cruz Biotechnology
Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	Cabra	Policlonal	WB (L.C/M/E.E)	BIORAD
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Cabra	Policlonal	WB (L.C/M/E.E)	BIORAD
Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	Cabra	Policlonal	IF	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Cabra	Policlonal	IF	Invitrogen
Diamidino-2-fenilindol (DAPI)			IF	Abbott Molecular/ Vysis

Tabla 7. Características de los anticuerpos secundarios utilizados. WB: western blot; IF: Inmunofluorescencia; IHQ: Inmunohistoquímica; (L.C): Línea celular; (M): MEF; (E.E): Extracto epidermal.

11. Ensayo de retardo en gel o EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).

11.1. Fraccionamiento subcelular.

Para los ensayos de retardo en gel, los extractos nucleares se obtuvieron a partir de células H23, H460 y H1299 tratadas con CBDCA (600 µg /ml) durante los periodos de tiempo indicados. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con el tampón A. El lisado se incubó 5 minutos a 4°C, se le añadió 1/5 de tampón de recuperación de sacarosa y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los extractos citoplasmáticos recogidos en el sobrenadante se guardaron a -80°C y los núcleos recogidos en el precipitado se lavaron con el tampón B y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se deseó el sobrenadante y se extrajeron las proteínas nucleares con el tampón C. Tras incubar durante 30 minutos en agitación a 4°C y centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante donde se encontraba el extracto nuclear y se deseó el precipitado.

Tampón A: 20 mM Hepes pH 8,0, 10 mM KCl, 0,15 mM EGTA, 0,15 mM EDTA, 0,15 mM espermina, 10% TritonX-100, 1 M DTT, 0,5 mM ABSF, 1 µg/ml leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina y 0,1 mM Na₃VO₄.

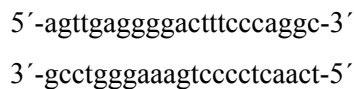
Tampón de recuperación de sacarosa: 50 mM Hepes pH 7,0, 0,25 mM EDTA, 10 mM KCl y 70% sacarosa.

Tampón B: 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl, 25% glicerol, 0,15 mM EGTA, 0,25 mM EDTA, 1,5 mM MgCl₂, 1 M DTT, 0,5 mM ABSF, 1 µg/ml leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina y 0,1 mM Na₃VO₄.

Tampón C: 20 mM Hepes pH 8,0, 50 mM NaCl, 25% glicerol, 0,15 mM EGTA, 0,25 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 M DTT, 0,5 mM ABSF, 1 µg/ml leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina y 0,1 mM Na₃VO₄.

11.2. Ensayo de retardo en gel o EMSA.

La sonda utilizada para detectar la presencia de NFκB en el núcleo contiene un elemento κB de la cadena de las Inmunoglobulinas que es reconocido por este factor de transcripción (219). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:



Esta sonda se marcó radiactivamente con P³²-γATP utilizando la T4 polinucleótido quinasa (Boehringer Mannheim).

Se incubaron 2 µg de proteína nuclear de cada una de las condiciones del experimento con la sonda marcada radiactivamente en tampón de reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se resolvieron los complejos ADN-proteína en un gel de poliacrilamida con una concentración del 3,5% en tampón de electroforesis, se secó el gel y se detectó la marca radiactiva mediante exposición a una película de autorradiografía Konica.

Para los ensayos de supermovilidad o supershift, se incubaron las muestras tratadas con CBDCA con los anticuerpos específicos de p50, p65 o RelB durante 15 minutos antes de la incubación con la sonda marcada radiactivamente.

Para realizar las competiciones específicas de unión a la sonda, se usó un exceso de 100 veces de la sonda con la secuencia consenso de unión a NFκB sin marcar radiactivamente y para las competiciones de unión inespecíficas, se usó un exceso de 100 veces de una sonda que contiene 2 mutaciones en el sitio κB.

Tampón de reacción: tampón de unión 2X (BB2X: 40mM Hepes pH 7,0, 140 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.01% NP-40, 100 µg/ml BSA y 4% Ficoll), 0,2 µg/ml Poly DIDC y tampón C.

12. Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia (IF). Análisis multiespectral.

La determinación inmunohistoquímica de SPC, CC10, ERK, Ki67 y caspasa3 en pulmones de ratones K-ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} y K-ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} tratados con 4-OHT se realizó a partir de secciones de 3 µm de bloques de los tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina como se detalla en el apartado 13.6. Las muestras se desparafinaron durante toda la noche a 60°C y al día siguiente se hidrató el tejido por baños consecutivos de 5 minutos en xilol, etanol al 100%, 96% y 70%. Posteriormente se sumergieron las secciones en agua destilada y se procedió a la recuperación antigénica en citrato sódico pH=6 durante 10 minutos. Se incubaron las muestras con 3% de H₂O₂ en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con 2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales y policlonales primarios SPC, CC10, ERK, Ki67 y caspasa3 se diluyeron 1:50, 1:1000, 1:300, 1:300 y 1:300 respectivamente, en 1% BSA en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados e incubados con el anticuerpo secundario EnVision durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones y como sustrato cromogénico se añadió diaminobenzidina (DAB) (EnVision *FLEX* DAB+ Chromogen; DAKO) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se contrastaron utilizando hematoxilina-eosina, para lo cual se deshidrataron progresivamente por inmersión en soluciones de alcohol de diferente grado y se secaron con xilol. Una vez realizada la deshidratación, se procedió a montar las secciones con cubreobjetos utilizando pegamento específico de tejido Pertex.

Los tejidos normales y tumorales de los ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} tratados o no con DMBA y/o TPA utilizados en este estudio, fueron cortados en secciones de 3 µm a partir de bloques de los tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina como se detalla en el apartado 13.6. Estos bloques contenían tanto papiloma escamoso, papiloma escamoso con displasia, carcinoma in situ o carcinoma invasivo como tejido no tumoral adyacente. La determinación inmunohistoquímica de Citoqueratina 10, loricrina, involucrina, Stat3 y p53 se realizó mediante el desparafinado y la rehidratación de las secciones, que posteriormente se sometieron a altas temperaturas y a presión para conseguir el desenmascaramiento de los antígenos de interés. Este desenmascaramiento se realizó con la incubación de las secciones en la solución EnVision *FLEX* Target Retrieval Solution High pH durante 20 minutos en el PTLINK (DAKO). A continuación, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante la incubación con EnVision *FLEX* Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) y se lavó con la solución EnvisionFlex wash buffer 20x (DAKO). Los anticuerpos policlonales primarios Citoqueratina 10, loricrina, involucrina, Stat3 y p53 se diluyeron 1:300, 1:200, 1:750, 1:500 y 1:500 respectivamente, en el

diluyente Envision Flex Antibody diluent (DAKO) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados con Envision Flex wash buffer 20x (DAKO) e incubados con el polímero de dextrano EnVision FLEX+ Mouse (DAKO) durante 30min a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con Envision Flex wash buffer 20x (DAKO) y como sustrato cromogénico se añadió diaminobenzidina (DAB) (EnVision *FLEX* DAB+ Chromogen; DAKO) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se contrastaron utilizando hematoxilina-eosina, para lo cual se deshidrataron progresivamente por inmersión en soluciones de alcohol de diferente grado y se secaron con xilol. Las inmunohistoquímicas se realizaron de forma automatizada utilizando un Autostainer (DAKO).

Para el análisis multiespectral, las imágenes de los casos de inmunohistoquímica se adquirieron a intervalos de 10nm de longitud de onda comprendidos entre 420 y 700nm usando el microscopio Leica DM2000 equipado con el sistema Nuance FX Multispectral Imaging System (CRI Inc.). Antes de la adquisición de los datos espectrales de cada imagen, se realizó una autoexposición de un área vacía del portaobjetos, para compensar las variaciones en la intensidad de la fuente, la eficiencia de transmisión del filtro y la sensibilidad de la cámara. Los colorantes puros para DAB y Hematoxilina se procesaron desde una librería creada y se emplearon para separar los colores de los cubos (agrupación de imágenes tomadas las diferentes longitudes de onda) de cada imagen usando el software Nuance 1.6.4. Para cada caso se tomaron las imágenes de referencia, seguido de tres imágenes representativas del tejido utilizando el mismo tiempo de exposición. Después de la deconvolución de las imágenes, los datos espectrales se corrigieron para compensar las irregularidades de iluminación y el fondo. Las señales positivas fueron convertidas a unidades de densidad óptica. El umbral de señal fue determinado creando un pseudo-color que resalta las señales positivas. El análisis cuantitativo de los marcadores de diferenciación (loricrina, involucrina y citoqueratina 10) dio datos de la intensidad media de las regiones de interés de la epidermis. Se calculó el valor medio de la intensidad de la señal de todas las regiones de interés de cada caso para el análisis estadístico.

Para los experimentos de inmunofluorescencia, los tejidos normales y tumorales de los ratones *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}* tratados o no con TPA utilizados en este estudio, fueron cortados en secciones de 3 μ m a partir de bloques de los tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina como se detalla en el apartado 13.6. Las secciones fueron desparafinadas y pretratadas con tampón citrato 10 mM pH6 (Target retrieval solution 10x S2031; DAKO), en olla exprés a presión máxima durante 3 minutos. A continuación, se incubaron con proteinasa K durante 10 minutos a 37°C en un Hybridizer (DAKO), se lavaron con una solución de lavado y los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-Bromodesoxiuridina 1 μ g/ml en diluyente (Envision Flex Antibody diluent; DAKO) a 30°C en un Hybridizer (DAKO) durante toda la

noche. Posteriormente, las secciones se lavaron con una solución de lavado, se deshidrataron progresivamente por inmersión en soluciones de alcohol de diferente grado y se incubaron con el anticuerpo secundario DAPI durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, se obtuvieron las imágenes con un microscopio de fluorescencia (Leica DM2000).

En el caso de las células H1299 y H23, se sembraron las células en portas colocados en placas de 60mm y se trataron con CBDCA (600 µg/ml) durante 30 minutos y 4 horas. Las células se fijaron en 80% etanol y se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con el reactivo EnVision *FLEX* Peroxidase-Blocking Reagent. A continuación se lavaron las células con la solución EnvisionFlex wash buffer 20x y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, p65 o RelB (dilución 1:200 en ambos casos), durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios Alexa 546 y Alexa 488 (dilución 1:1000 en ambos casos) conjuntamente durante 1 hora, se volvieron a lavar y se contrañeron con el anticuerpo secundario DAPI durante 45 minutos. Finalmente, se obtuvieron las imágenes con un microscopio de fluorescencia (Leica DM2000).

13. Modelos animales.

13.1. Líneas de ratones utilizadas.

Las diferentes cepas de ratones empleadas en esta memoria, así como sus características y origen, se detallan en la Tabla 8.

Cepa	Características	Comentario	Procedencia
<i>mkp1</i>^{+/+}	Línea WT para MKP1	Cepa consanguínea de ratones sin ninguna alteración genética denominada C57BL/6-129SVJ	Dra. Carme Caelles
<i>mkp1</i>^{-/-}	Línea KO para MKP1	Cepa generada por interrupción del exón 2 por inserción de un casete de resistencia a neomicina (75) en ratones con fondo genético C57BL/6-129SVJ	Dra. Carme Caelles
<i>K-Ras</i>^{+V12}	Línea HT para K-ras ^{V12}	Cepa obtenida por mutación con pérdida de sentido en la que se produce el cambio de base G→T en la segunda base del codón 12 del locus del gen K-Ras (108) en ratones con fondo genético C57BL/6.	Dra. Carmen Guerra y Dr. Mariano Barbacid
<i>RERT</i>^{+ert}	Línea KI para la recombinasa Cre-ERT2	Cepa que expresa la recombinasa inducible Cre-ERT2 (36) bajo el control del locus que codifica la subunidad grande de la ARN polimerasa II en ratones con fondo genético C57BL/6.	Dra. Carmen Guerra y Dr. Mariano Barbacid
<i>K-Ras</i>^{+V12}; <i>RERT</i>^{+ert}; <i>mkp1</i>^{+/+}	Línea triple: HT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y WT para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras</i>^{+V12}; <i>RERT</i>^{+ert}; <i>mkp1</i>^{-/-}	Línea triple: HT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y KO para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras</i>^{+V12}; <i>RERT</i>^{+ert}; <i>mkp1</i>^{+/-}	Línea triple: HT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y HT para MKP1		Cepa generada en el laboratorio

<i>K-Ras^{+/+};</i> <i>RERT^{+ert};</i> <i>mkp1^{+/+}</i>	Línea triple: WT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y WT para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras^{+/+};</i> <i>RERT^{+ert};</i> <i>mkp1^{-/-}</i>	Línea triple: WT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y KO para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras^{+/+};</i> <i>RERT^{+ert};</i> <i>mkp1^{+/-}</i>	Línea triple: WT para K-ras ^{V12} , KI para la recombinasa Cre-ERT2 y HT para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras^{+/+};</i> <i>RERT^{+/+};</i> <i>mkp1^{+/+}</i>	Línea triple: WT para K-ras ^{V12} , WT para la recombinasa Cre-ERT2 y WT para MKP1		Cepa generada en el laboratorio
<i>K-Ras^{+/+};</i> <i>RERT^{+/+};</i> <i>mkp1^{-/-}</i>	Línea triple: WT para K-ras ^{V12} , WT para la recombinasa Cre-ERT2 y KO para MKP1		Cepa generada en el laboratorio

Tabla 8. Características de las cepas de ratones utilizadas. WT: wild type; KO: knock-out; HT: heterocigoto; KI: knock-in.

Cada una de las líneas HT o WT para K-ras^{V12} y KI o WT para la recombinasa Cre-ERT2 se mantuvo por separado y se cruzaron entre sí y con las líneas de los diferentes genotipos de MKP1, para obtener las distintas combinaciones de genotipos en la misma camada y reducir así la posible variabilidad genética.

13.2. Genotipaje de las colonias utilizadas.

13.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de colas de ratón.

El genotipo de los diferentes ratones se identificó a partir de ADN genómico extraído de las colas de los ratones conservadas a -80°C, utilizando el kit comercial REDExtract-N-AmpTM tissue PCR kit (XNAT kit, Sigma). Las colas se incubaron en una mezcla formada por una solución de preparación del tejido y una solución de extracción durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las muestras a 95°C durante 3 minutos y a continuación se les añadió una tercera solución de neutralización. El ADN aislado se guardó a -20°C o se utilizó directamente para realizar la PCR como se indica en el siguiente apartado.

13.2.2. PCR para genotipado de los ratones.

Una alícuota del ADN genómico extraído se añadió directamente sobre una mezcla de PCR suministrada por el proveedor del kit y los diferentes cebadores y se procedió a realizar la PCR. En la Tabla 9 se detallan los cebadores, los programas seguidos y los productos de PCR obtenidos en cada una de las PCR realizadas para identificar las modificaciones genéticas de cada cepa murina utilizada en esta memoria.

Cepa	Cebador: Secuencia (5' - 3')	Programa de termociclador	Tamaño del amplicón (pb)		
			+/+	+/-	-/-
mkp1	GAGGATATGAAGCGTTTTCGG	94°C 5m / (94°C 1m / 50°C 1m / 72°C 1m) 30 ciclos / 72°C 7m	220	220 / 300	300
	CCAGCTCATTCTCCACTCATG				
	CCTGGCACAAATCCTCCTAGAC				
K-Ras	CACTGGACACTGAGGGTCA	94°C 2m / (94°C 40s / 55°C 40s / 72°C 1m) 35 ciclos / 72°C 10m	270	270 / 500	---
	CATACTGGGTCTGCCTTA				
	GATGCCTGCTTGCCGAATAT				
RERT	TGAGCGAACAGGGCGAA	94°C 2m / (94°C 40s / 55°C 40s / 72°C 1m) 35 ciclos / 72°C 10m	400	400 / 700	700
	GTCAGTACACATACAGACTT				
	TCCATGGAGCACCCAGTGAA				

Tabla 9. Características de las PCR utilizadas para el genotipado de las diferentes cepas de ratón.

13.3. Mantenimiento de las colonias experimentales.

Los ratones de las cepas *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} utilizadas en este trabajo se mantuvieron en un fondo genético mixto C57BL/6 X 129SVJ y los ratones de las líneas *K-Ras*^{+V12} y *RERT*^{+ERT} en un fondo genético puro C57BL/6. Se establecieron colonias de entre 15 y 30 ratones (según la cepa) de cada genotipo mediante cruces en heterocigosis y homocigosis (cuando fue posible). Todos los ratones fueron criados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del C.S.I.C., en salas específicas de esta especie ventiladas, esterilizadas y manteniéndose controladas las condiciones de luz, temperatura, humedad, presión, comida y agua, cumpliendo los requisitos necesarios para estabular dichas especies (nº de registro en la Dirección General de Ganadería 28079 –37-A). Todos los ratones fueron viables y fértiles, y mostraron un ratio normal de machos y hembras en la progenie. La esperanza de vida de estos ratones fue similar a la presentada por los ratones control y no se observó ningún problema de salud visible. Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ con el fin de evitar el sufrimiento del animal. Todos los procedimientos con los animales se llevaron a cabo basándose en lo estipulado por el Consejo de las Comunidades Europeas, directiva 86/609/EEC.

13.4. Ensayos carcinogénicos.

13.4.1. Tratamiento con 4-Hidroxitamoxifeno.

El 4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT) tiene una estructura química de tipo esteroídico por lo que únicamente es soluble en disolventes orgánicos (acetona, etanol, cloroformo... *etc.*). Estos solventes nunca pueden ser utilizados como vehículo en la administración intraperitoneal por los importantes efectos tóxicos que desencadenan. Para la administración del 4-OHT recurrimos a la preparación de una suspensión del mismo en aceite de maíz utilizando para ello un sonicador. Esta preparación es bastante inestable por lo que se debe reconstituir de nuevo, por sonicación, antes de cada administración.

La activación del alelo K-Ras^{V12} se llevó a cabo cuando los ratones tenían entre 2 y 3 meses de edad mediante una única inyección intraperitoneal de 500 µg de 4-OHT homogeneizado en aceite de maíz (Sigma). Pasados 8 meses de la inyección, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂ y se procedió a la necropsia como se indica en el apartado 13.5. La Tabla 10 muestra el número de ratones por el que estaba formado cada grupo experimental.

K-Ras	RERT	mkp1	Nº ratones	
HT	KI	WT	10	+ 4-OHT
HT	KI	HT	13	
HT	KI	KO	9	
WT	KI	WT	6	
WT	KI	HT	4	
WT	KI	KO	4	
WT	WT	WT	6	
WT	WT	KO	6	
HT	KI	WT	2	- 4-OHT
HT	KI	HT	3	
HT	KI	KO	3	
WT	KI	WT	2	
WT	KI	HT	1	
WT	KI	KO	1	
WT	WT	WT	4	
WT	WT	KO	4	

Tabla 10. Número de ratones que forman cada grupo experimental. WT: wild type; HT: heterocigoto; KO: knock-out; KI: knock-in; 4-OHT: 4-Hidroxitamoxifeno.

13.4.2. Inducción química de tumores de piel de ratón.

Los tumores fueron inducidos en la piel dorsal de los ratones previamente afeitados. Cada grupo experimental estaba formado por 17 ratones $mkp1^{+/+}$ y 16 ratones $mkp1^{-/-}$ de entre 12 y 14 semanas. Los ratones recibieron una única dosis tópica en piel de 32 μ g de DMBA diluido en 200 μ l de acetona y una semana después, se les aplicó dos dosis semanales de 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona cada una, durante 14 semanas. Los ratones control se trataron sólo con 200 μ l de acetona en cada aplicación. A lo largo de todo el experimento, los ratones fueron afeitados el día previo al tratamiento para favorecer la distribución tópica del agente químico, hasta que aparecieron las lesiones. Una vez por semana, se examinó detenidamente la piel de los animales, cuantificando el número de ratones que presentaba lesión cutánea (incidencia), así como el número de lesiones observadas en cada animal (multiplicidad). Al término del experimento, 24 semanas después de aplicar la primera dosis de TPA, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO_2 y se procedió a la necropsia como se indica en el apartado 13.5.

13.4.3. Tratamiento agudo con DMBA y TPA de la piel de ratones adultos.

Se seleccionaron dos grupos experimentales de 18 ratones $mkp1^{+/+}$ y 18 ratones $mkp1^{-/-}$ de entre 3 y 5 meses de edad. Se afeitó el lomo de los ratones y 3 días después, 16 ratones de cada genotipo fueron tratados tópicamente en la piel dorsal con 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona. A las 24 horas del tratamiento se sacrificaron 4 ratones tratados con TPA y 2 ratones no tratados de cada genotipo; los 12 ratones restantes $mkp1^{+/+}$ y 12 ratones $mkp1^{-/-}$ fueron tratados tópicamente en la piel dorsal con 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona. Pasadas 24 horas del tratamiento se sacrificaron 4 ratones de cada genotipo y los 8 ratones restantes de cada genotipo fueron tratados tópicamente en la piel dorsal con 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona. Este procedimiento se repitió durante 24 y 48 horas más. Para el estudio del efecto del tratamiento agudo con DMBA se realizó el mismo protocolo aplicando 32 μ g de DMBA diluido en 200 μ l de acetona en la piel dorsal de los ratones. Todos los ratones tratados con TPA fueron inyectados intraperitonealmente con bromodesoxiuridina (BrdUrd) 1 hora antes de ser sacrificados. La dosis empleada fue de 100 μ g de una solución 10 mg/ml de BrdUrd disuelta en PBS y NaOH, por cada gramo de peso del ratón. Finalmente, se procedió a la necropsia y procesamiento de las pieles como se indica en el apartado 13.5.

13.4.4. Tratamiento con DMBA y TPA de piel de ratón para el estudio de la expresión de quinasas.

Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones $mkp1^{+/+}$ (n=12) y $mkp1^{-/-}$ (n=12) de ambos sexos de entre 2 y 3 meses de edad. Se afeitó el lomo de los ratones y 3 días después se

les aplicó tópicamente en la piel dorsal 32 µg de DMBA diluido en 200 µl de acetona, 12,5 µg de TPA diluido en 200 µl de acetona o 200 µl de acetona que servirá como control. Tres horas después del tratamiento, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂ y se procedió a la obtención de los extractos proteicos epidermales como se indica en el apartado 10. Finalmente, se realizó el análisis de expresión de proteínas mediante la técnica de western blot como se indica en el apartado 10.

13.5. Necropsia y procesamiento de pieles.

Una vez sacrificados los animales, se llevó a cabo la necropsia completa y se recogieron muestras de determinados tejidos para realizar el análisis histológico y molecular. La manipulación de las muestras obtenidas se realizó en un entorno aséptico y con material estéril, procurando que el período de tiempo en el que la muestra se encontró a temperatura ambiente, sin fijar, fuera el mínimo posible. En los ratones tratados con DMBA y/o TPA se recogió sólo la piel, mientras que en aquellos que se trataron con 4-OHT se recogieron diferentes tejidos tanto si eran normales como si estaban alterados (pulmón, piel, patas, labios, páncreas, colon, estómago, bazo e hígado). Las muestras se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4% tamponado en PBS, en el mismo quirófano, y se guardaron 24 horas a 4°C para asegurar una buena fijación. Posteriormente, se lavaron en PBS hasta la eliminación de los restos de fijador y se procedió a la inclusión de las piezas en parafina como se indica en el apartado 13.6. También se recogieron muestras de tejidos normales y tumorales que se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C. Algunos de estos tejidos congelados se disgregaron y lisaron con solución de lisis celular para extracción de proteína como se describe en el apartado 10 y se utilizaron para analizar la expresión de determinadas proteínas por western blot.

13.6. Inclusión de muestras en parafina.

La inclusión de las muestras en parafina se realizó a través de la deshidratación previa de las muestras mediante lavados con concentraciones crecientes de etanol hasta llegar al etanol absoluto (2 lavados de 1 hora cada uno a 40°C). Posteriormente, se lavaron dos veces con xilol durante 1 hora a 40°C y finalmente, las piezas se sumergieron en dos baños consecutivos de parafina a 60°C, de 3 horas cada uno.

Los bloques se realizaron con parafina limpia a 60°C depositada en moldes metálicos, donde las piezas se orientaron convenientemente. La inclusión definitiva se realizó con ayuda de casetes, dejando que la parafina se solidificara a temperatura ambiente y en placa fría, para posteriormente terminar de solidificar en nevera a 4°C.

Una vez incluidas las muestras, se obtuvieron bloques de los que se hicieron varias secciones de 3 µm en un microtomo automático (Microm) que se tiñeron con hematoxilina-eosina y/o diferentes anticuerpos como se describe en el apartado de Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia (12).

13.7. Tinción con hematoxilina-eosina.

Se procedió al desparafinado de las secciones utilizando xilol (3 pases de 5 minutos cada uno) y se rehidrataron empleando concentraciones decrecientes de etanol durante 3 minutos cada uno, desde el etanol absoluto hasta el etanol al 70%, para acabar con tres lavados de agua destilada durante 5 minutos cada uno. Tras desparafinar y rehidratar las secciones se procedió a su tinción con hematoxilina (Hematoxylin solution modified acc. to Gill III ref: 1051742500) durante 10 minutos y se lavaron en agua destilada durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó la tinción con eosina (Eosin Y solution 0.5% aqueous ref: 1.09844) durante 1 minuto, se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol de 10 minutos cada lavado hasta etanol absoluto, y dos lavados con xilol durante 10 minutos cada uno. Una vez realizada la deshidratación, se procedió a montar las secciones con cubreobjetos utilizando Eukitt.

13.8. Tinción de LacZ con X-Gal.

Para la tinción de LacZ de los pulmones de ratones tratados con 4-OHT se hicieron cortes del tejido pulmonar en secciones de 10 µm en un criostato a partir de bloques de los tejidos embebidos en OCT. Se dejaron los cortes a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se introdujeron en la solución fijadora durante 5-10 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron los cortes con la solución de lavado y a continuación se realizaron dos lavados adicionales de 20 minutos cada uno. Posteriormente, los cortes se incubaron con la solución de tinción en una estufa durante toda la noche y al día siguiente se lavaron con la solución de lavado. Se hicieron dos lavados más de 20 minutos cada uno y se sumergieron en PBS1X durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron los cortes con agua destilada, se dejaron secar durante 5 minutos y se contrastaron incubando durante 1 minuto con Nuclear Fast Red (Sigma). Se lavaron los tejidos con agua destilada y se deshidrataron siguiendo un protocolo convencional en gradiente de concentraciones de etanol y xilol absoluto. Una vez realizada la deshidratación, se procedió a montar las secciones con cubreobjetos utilizando pegamento específico de tejido Pertex.

Solución fijadora: 0,2% Glutaraldehído, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,1 M solución fosfato sódico en agua.

Solución de lavado: 0,1 M solución fosfato sódico, 2 mM MgCl₂, 0,01% deoxicolato sódico, 0,02% Nonidet P-40 en agua.

Solución de tinción: 1mg/ml X-Gal, 1 mM Espermidina HCl, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6 \cdot 6H_2O$ en solución de lavado.

13.9. Análisis patológico.

La evaluación morfológica de las lesiones y de la piel adyacente de las secciones teñidas con hematoxilina-eosina y con los diferentes anticuerpos se llevó a cabo en un microscopio Leica DM2000. La morfometría (grosor) de la epidermis se determinó con la aplicación de medida del microscopio Leica DMD108.

13.10. Extracción de epidermis a partir de piel de ratón.

Después de exponer los ratones a los diferentes tratamientos se sacrificaron mediante inhalación de CO_2 , se colocaron en un recipiente con hielo aislado para mantener el ratón frío y conservar la piel evitando que se moje ésta, y se procedió a la extracción de la epidermis de la piel. Para ello, se extrajo la piel del ratón y se colocó estirada sobre una placa de 35mm, 60mm o 10cm dependiendo del tamaño del tejido, orientando la dermis hacia abajo y la epidermis hacia arriba y evitando la formación de arrugas. Se añadió tripsina 0,25% (Gibco) en la placa de modo que el tejido flote pero no se moje la epidermis y se incubó durante 4 horas a 37°C. A continuación, se colocó la piel en otra placa y utilizando dos pinzas de punta fina se separó la epidermis de la dermis y se almacenaron por separado a -80°C hasta proceder a la extracción de proteínas como se indica en el apartado 10.

14. Análisis estadístico.

Los datos que se muestran son la media \pm la desviación estándar (S.D) de al menos tres experimentos independientes. Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos con ratones, las comparaciones de medias entre variables continuas se realizó utilizando el test U de Mann-Whitney en el caso de distribuciones no normales, o t de *Student* para distribuciones normales.

Valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

15. Consideraciones éticas.

El uso de las muestras procedentes de tumores humanos para este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos los pacientes dieron un consentimiento informado. Asimismo, todos los animales de experimentación utilizados en este trabajo han sido mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del C.S.I.C, siguiendo las directrices de la autoridad competente del Gobierno Español y de acuerdo a las normas establecidas por el Consejo de las Comunidades Europeas, directiva 86/609/EEC.

Resultados

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN RESPUESTA A DIFERENTES AGENTES ANTITUMORALES.

Como hemos comentado en la introducción, una de las principales causas de muerte por cáncer es el desarrollo de resistencia de las células tumorales a la radioterapia y/o quimioterapia. El tratamiento con algunos agentes antitumorales induce supervivencia celular o muerte celular programada o apoptosis mediante la activación de distintas rutas de señalización entre las que se encuentran las MAPKs, cuya actividad es regulada por la proteína con actividad fosfatasa MKP1. Basándonos en esto nos planteamos que la regulación de estas quinasas por MKP1 podría contribuir a la sensibilización de las células tumorales a dichos agentes. Por este motivo, decidimos investigar el papel de MKP1 en respuesta a diferentes agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento del cáncer en clínica, y si existe alguna relación con la apoptosis inducida por éstos. Como sistema modelo utilizamos fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) derivados de ratones nulos para MKP1.

1.1. Expresión de la proteína MKP1 en células MEFs derivadas de ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Seleccionamos un grupo de ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ e identificamos su genotipo mediante PCR a partir de ADN genómico extraído de las colas de los animales obtenidas justo después de ser sacrificados. La figura 1A muestra la expresión de los alelos wild types en los ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y la expresión de los alelos mutantes en los ratones hembras $mkp1^{-/-}$. Cuando estos ratones hembras se encontraban en el día 13,5 post-concepción, extrajimos los embriones y generamos fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) a partir de ellos como se describe en materiales y métodos. Para comprobar la presencia o ausencia de expresión de MKP1 en estas células analizamos la expresión de esta fosfatasa en los MEFs mediante western blot. El análisis por inmunoblot mostró la expresión de la fosfatasa MKP1 en los MEFs $mkp1^{+/+}$ mientras que la interrupción del gen $mkp1$ produjo la pérdida completa de la proteína MKP1 en las células MEFs $mkp1^{-/-}$ (Figura 1B), coincidiendo con el genotipo de los ratones hembras utilizados para generar las correspondientes células MEFs.

Estos resultados demuestran que los MEFs $mkp1^{+/+}$ utilizados en este trabajo expresan la proteína MKP1, mientras que los MEFs $mkp1^{-/-}$ carecen de la expresión de la fosfatasa.

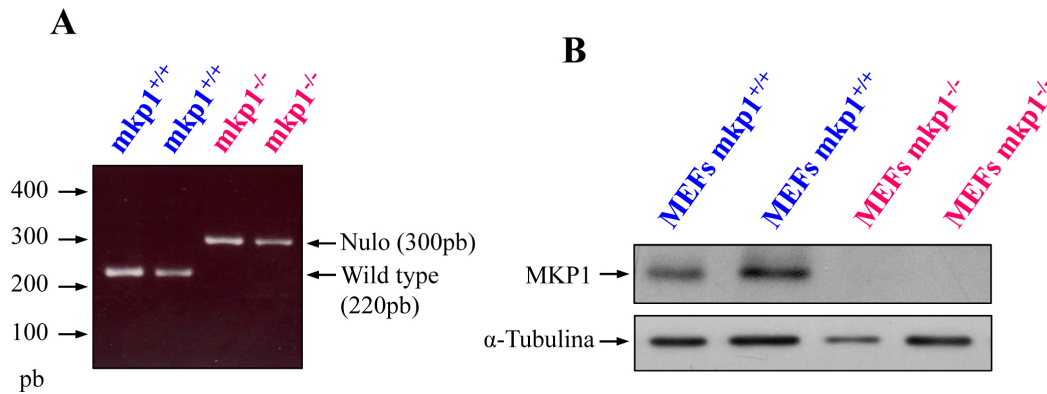


Figura 1: Análisis de la expresión de MKP1 en ratones y MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$. Se seleccionaron 2 ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ en día 13,5 post-concepción y se sacrificaron. Se les cortó un trozo de cola, se extrajo el útero de cada animal y se procedió a la generación de las células MEFs como se describe en materiales y métodos. **A)** Se extrajo el ADN genómico de las colas de los ratones hembras $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ y se confirmó el genotipo de MKP1 mediante PCR. Las bandas superiores (300pb) corresponden al alelo mutante y las bandas inferiores (220pb) corresponden al alelo wild type. pb: pares de bases. **B)** Se obtuvieron los extractos proteicos de las células MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ generadas a partir de los ratones hembras del apartado A y se estudió mediante western blot la expresión de MKP1. Como control de carga se utilizó α -Tubulina.

1.2. Supervivencia celular de MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ en respuesta a diferentes agentes antitumorales.

En primer lugar estudiamos la viabilidad celular de MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ tras tratamientos con varios fármacos antineoplásicos en una curva de dosis repuesta. Entre los agentes antitumorales empleados en las terapias oncológicas seleccionamos algunos compuestos que pueden dividirse en tres categorías en función de cómo actúan y cómo afectan a las células cancerosas. Dentro del grupo de **agentes quimioterápicos que afectan a la estructura del ADN** elegimos los agentes alquilantes cis-Platino (CDDP), carboplatino (CBDCA) y Oxaliplatino (OXALI-Pt), los inhibidores de Topoisomerasas doxorubicina (DOXO) y etopósido (ETOP) y el agente que causa rotura en las dos cadenas del ADN, bleomicina (BMC). Entre los **agentes que afectan la síntesis del ADN** escogimos el 5-fluorouracilo (5-FU, análogo de pirimidina); y finalmente, de la categoría de **agentes que afectan al citoesqueleto** decidimos utilizar la vincristina (VINC) y el taxol (TAXOL).

Como se muestra en la tabla 1 el tratamiento con agentes alquilantes (CDDP, CBDCA y OXALI-Pt) induce una mayor sensibilidad en las células que no expresan la fosfatasa respecto a las células que sí la expresan, como se observa por una disminución de más de la mitad en la IC_{50} de los tres compuestos. Por el contrario, el tratamiento con inhibidores de topoisomerasas (ETOP y DOXO), agentes que producen rotura de doble cadena en el ADN (BMC) y agentes que afectan al citoesqueleto (VINC y TAXOL) o a la síntesis de ADN (5-FU), no produce

diferencias significativas en la sensibilidad entre ambas líneas celulares. Esto sugiere que MKP1 regula de forma específica la sensibilidad a agentes alquilantes.

Agentes quimioterápicos	IC ₅₀	
	MEFs mkp1 ^{+/+}	MEFs mkp1 ^{-/-}
CDDP (µg/ml)	2,1 ± 0,063	0,7 ± 0,021
CBDCA (µg/ml)	71 ± 2,130	32 ± 0,960
OXALI-Pt (µg/ml)	14 ± 0,420	4,9 ± 0,147
ETOP (µM)	15 ± 0,450	11,4 ± 0,342
DOXO (µM)	0,004 ± 0,00012	0,003 ± 0,00009
BMC (U/ml)	0,0007 ± 0,000021	0,0009 ± 0,000027
VINC (µM)	0,007 ± 0,00021	0,004 ± 0,00012
TAXOL (µM)	0,42 ± 0,0126	0,41 ± 0,0123
5-FU (µM)	>200	>200

Tabla 1: Sensibilidad de las células MEFs mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} en respuesta al tratamiento con diferentes agentes antitumorales. Se sembraron ambas líneas celulares y al día siguiente se trataron con los agentes quimioterápicos indicados en una rango de concentraciones específico para cada compuesto. Tras 72 horas de incubación se determinó el porcentaje de células viables mediante la técnica de cristal violeta. En la tabla se indica los valores de IC₅₀ correspondiente a cada línea celular en respuesta al tratamiento con los distintos agentes antineoplásicos. Los datos representan la media ± S.D de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. CDDP, cis-Platino; CBDCA, carboplatino; OXALI-Pt, oxaliplatino; ETOP, etopósido; DOXO, doxorubicina; BMC, bleomicina; VINC, vincristina; TAXOL, taxol; 5-FU, 5-Fluorouracilo.

1.3. Activación de las vías de las MAPKs en respuesta a diferentes agentes quimioterapéuticos en MEFs mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-}.

Con el fin de determinar si las diferencias observadas en la sensibilidad a los diferentes agentes quimioterápicos son debidas a la regulación de las MAPKs por MKP1, decidimos investigar el efecto de la ausencia de la fosfatasa sobre la activación de las rutas de señalización pertenecientes a la familia de las MAPKs tras tratamiento con los diferentes agentes antitumorales.

1.3.1. Rutas de muerte celular activadas por distintos agentes quimioterapéuticos en MEFs mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-}.

El estudio de las actividades de JNK1/2 y p38 en respuesta a los distintos agentes antineoplásicos, nos permitió observar que el tratamiento de las células MEFs mkp1^{-/-} con los agentes alquilantes produce una fuerte activación de las actividades de JNK1/2 y p38 que no tiene lugar en las células MEFs mkp1^{+/+} (Figura 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la actividad de las MAPKs entre ambas líneas celulares tras ser tratadas con el resto de los agentes antitumorales utilizados en este estudio (Figura 2).

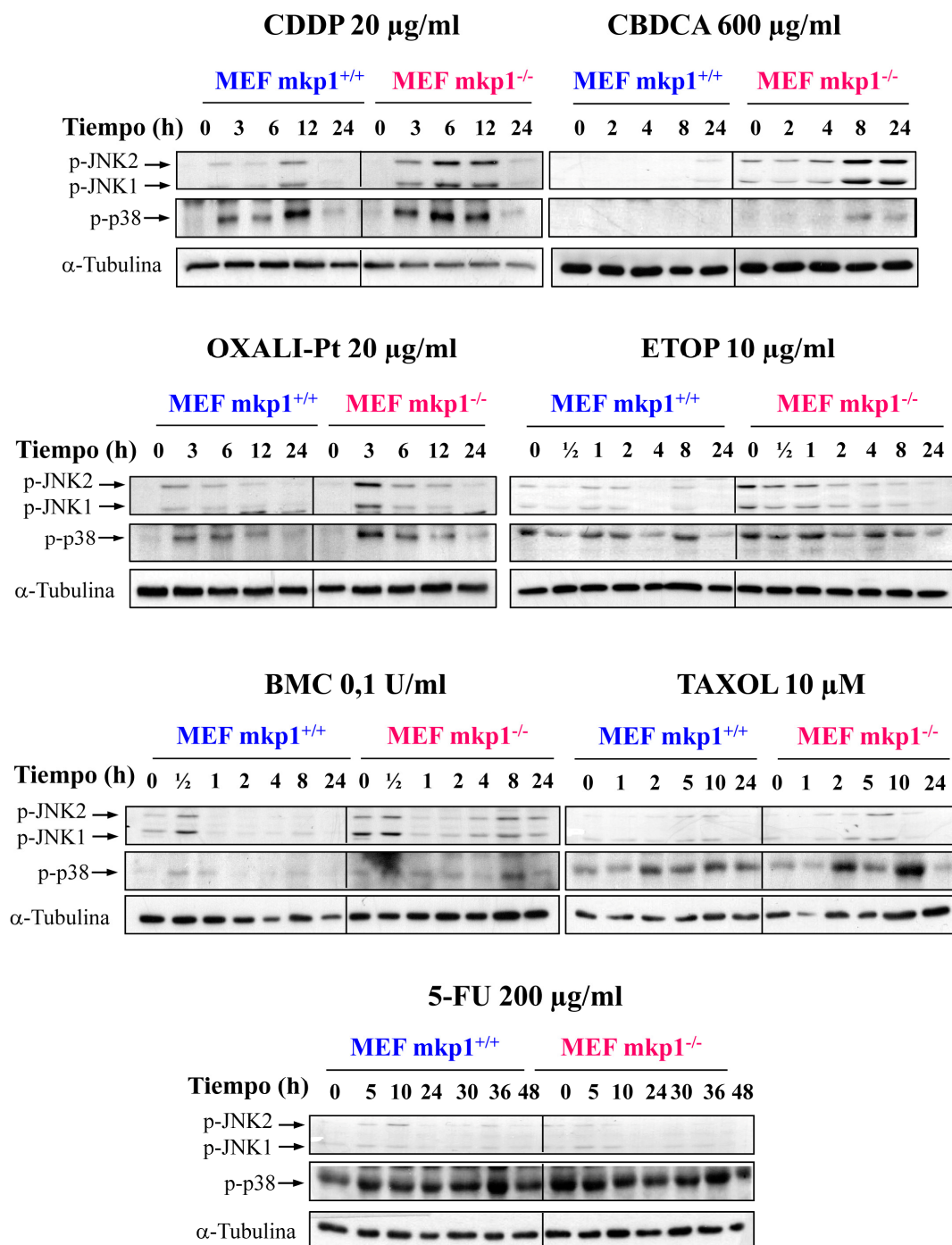


Figura 2: Cinéticas de activación de JNK1/2 y p38 en las células MEFs *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} en respuesta a diferentes agentes antitumorales. Las células MEFs *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} fueron tratadas con los diferentes agentes quimioterápicos a una concentración específica para cada compuesto durante los periodos de tiempo indicados. Se obtuvieron los extractos proteicos celulares y se estudiaron mediante western blot los cambios en la fosforilación de JNK1/2 y p38, utilizando anticuerpos específicos para las formas activas. Como control de carga se utilizó α-Tubulina. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. CDDP, cis-Platino; CBDCA, carboplatino; OXALI-Pt, oxaliplatino; ETOP, etopósido; BMC, bleomicina; TAXOL, taxol; 5-FU, 5-Fluorouracilo.

Como marcador apoptótico estudiamos la activación de la caspasa-3 tras 24 horas de tratamiento de las células MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ con los diferentes agentes quimioterapéuticos, y observamos que el tratamiento con todos los agentes antitumorales induce un aumento en la activación de esta caspasa en las células MEFs $mkp1^{-/-}$ respecto a las MEFs $mkp1^{+/+}$, siendo el efecto mayor cuando se trata con los agentes alquilantes, especialmente con carboplatino (Figura 3), lo que coincide con el aumento de actividad JNK1/2 y p38 observados anteriormente.

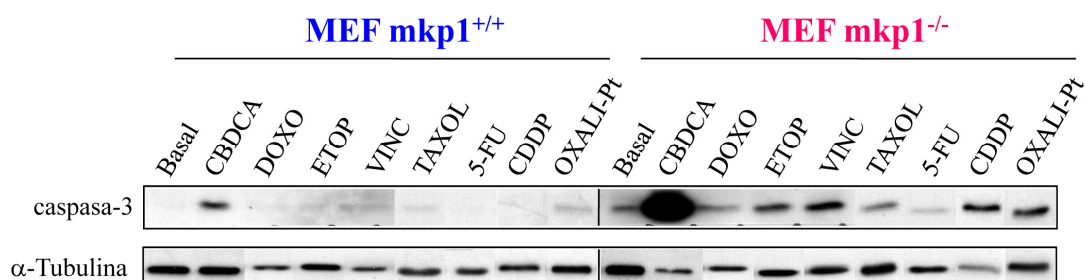


Figura 3: Activación de caspasa-3 en las células MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ en respuesta a diferentes agentes antitumorales. Las células MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ fueron tratadas con 600 μ g/ml CBDCA, 0,2 μ M DOXO, 10 μ g/ml ETOP, 0,1 μ g/ml VINC, 10 μ M TAXOL, 200 μ g/ml 5-FU, 20 μ g/ml CDDP y 20 μ g/ml OXALI-Pt durante 24 horas. Se obtuvieron los extractos proteicos celulares y se estudió mediante western blot la activación de caspasa-3. Como control de carga se utilizó α -Tubulina. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. CBDCA, carboplatino; DOXO, doxorubicina; ETOP, etopósido; VINC, vincristina; TAXOL, taxol; 5-FU, 5-Fluorouracilo; CDDP, cis-Platino; OXALI-Pt, oxaliplatino.

1.3.2. Rutas de supervivencia celular activadas por distintos agentes quimioterapéuticos en MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Finalmente estudiamos la activación de la vía de supervivencia ERK1/2 en las células MEFs $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ tras tratamiento con los distintos agentes quimioterápicos. No observamos diferencias significativas en la cinética y magnitud de activación de esta quinasa entre ambas líneas celulares en ningún caso (Figura 4), lo que sugiere que la actividad de ERK1/2 es independiente de la expresión de MKP1 en respuesta a los diferentes agentes antineoplásicos.

El conjunto de estos resultados nos hizo pensar que la función de MKP1 es específica para la regulación de la apoptosis inducida por agentes alquilantes regulando la actividad de JNK1/2 y p38, ya que en el resto de compuestos no existe correlación entre activación de quinasas y sensibilidad a los mismos, señalando a MKP1 como un importante mediador de quimioresistencia.

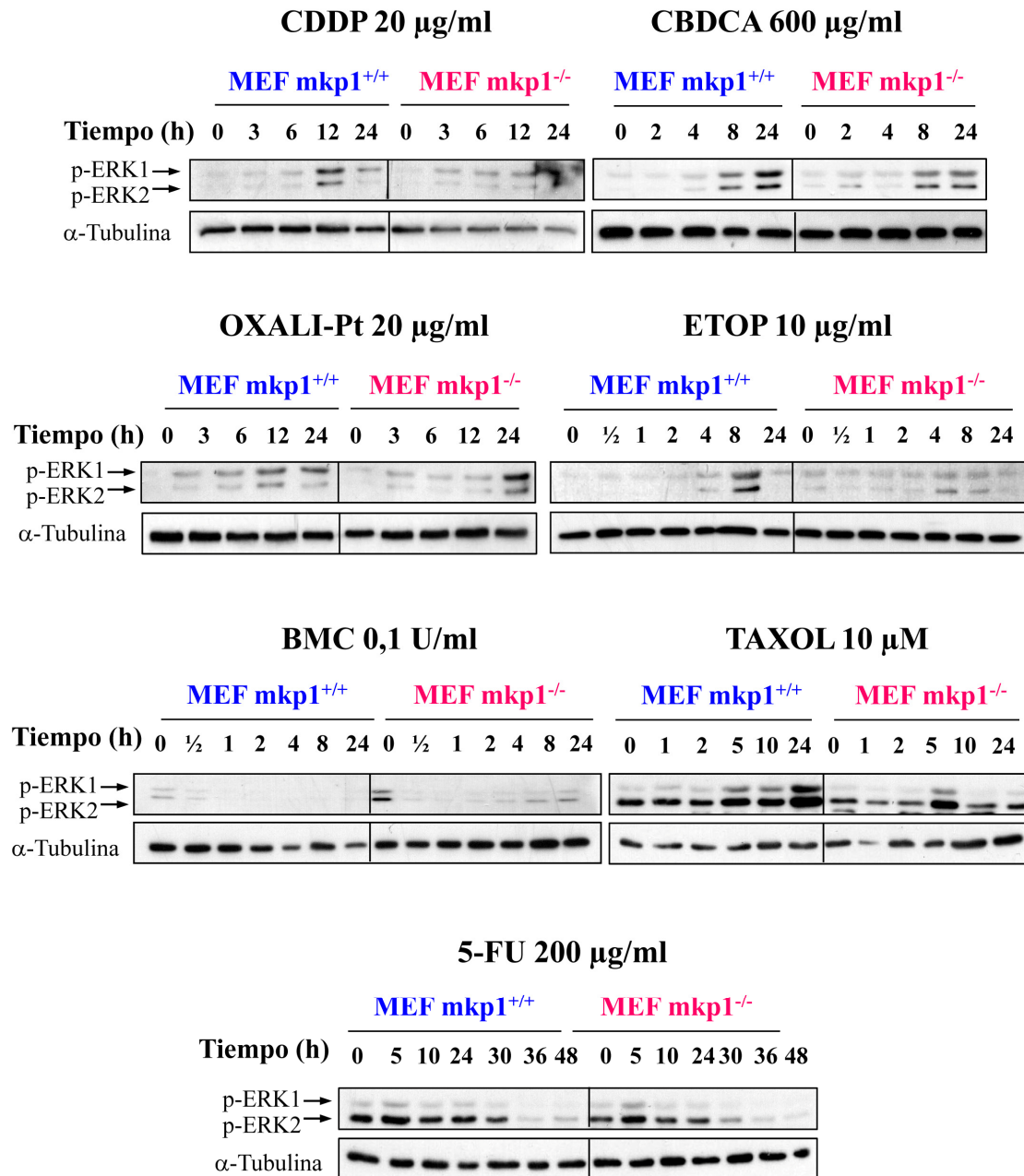


Figura 4: Cinética de activación de la quinasa ERK1/2 en las células MEFs *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} en respuesta a diferentes agentes antitumorales. Las células MEFs *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} fueron tratadas con los diferentes agentes quimioterápicos a una concentración específica para cada compuesto durante los periodos de tiempo indicados. Se obtuvieron los extractos proteicos celulares y se estudiaron mediante western blot los cambios en la fosforilación de ERK1/2. Como control de carga se utilizó α-Tubulina. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. CDDP, cis-Platino; CBDCA, carboplatino; OXALI-Pt, oxaliplatino; ETOP, etopósido; BMC, bleomicina; TAXOL, taxol; 5-FU, 5-Fluorouracilo.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL CARBOPLATINO EN CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN.

Diversos estudios en diferentes sistemas celulares han demostrado que el tratamiento con CDDP induce desarrollo de resistencia a quimioterapia en algunos tumores, entre ellos el CNMP (127). También se ha observado desarrollo de resistencia a CBDCA en el tratamiento del CNMP (140, 254, 263). El mecanismo de acción antitumoral del CDDP está bien caracterizado, sin embargo, el mecanismo por el cual el CBDCA ejerce su efecto antineoplásico está aún poco estudiado. Por esta razón, decidimos estudiar el mecanismo molecular de acción del CBDCA en CNMP, utilizando como referencia el CDDP.

2.1. Supervivencia celular y apoptosis inducida por carboplatino en líneas celulares de CNMP.

En primer lugar estudiamos la respuesta de tres líneas celulares diferentes derivadas de CNMP al tratamiento con CBDCA, usando como control el CDDP. Para ello, seleccionamos tres líneas tumorales de CNMP humano: H23, que procedía de un tumor primario de pulmón no metastásico (258); H460, que procedía de un carcinoma de efusión pleural metastásico (ATCC); y H1299, cuyo origen era una metástasis en un nódulo linfático de un tumor de pulmón (258). Estudiamos la viabilidad celular de estas tres líneas celulares tras ser tratadas durante 72 horas con diferentes dosis de CBDCA o CDDP. Como se observa en la figura 5, tras tratamiento con ambos fármacos la viabilidad de las líneas celulares H23 y H460 es muy similar entre sí,

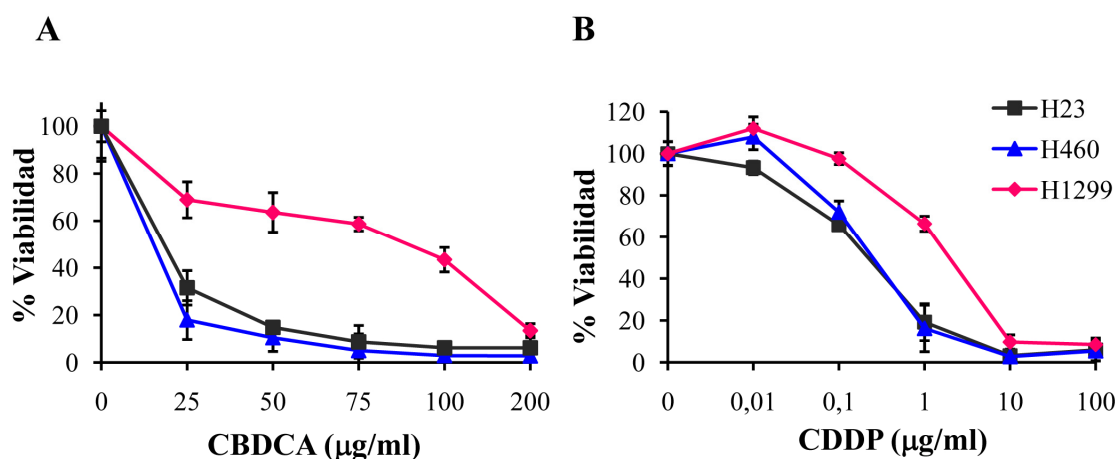
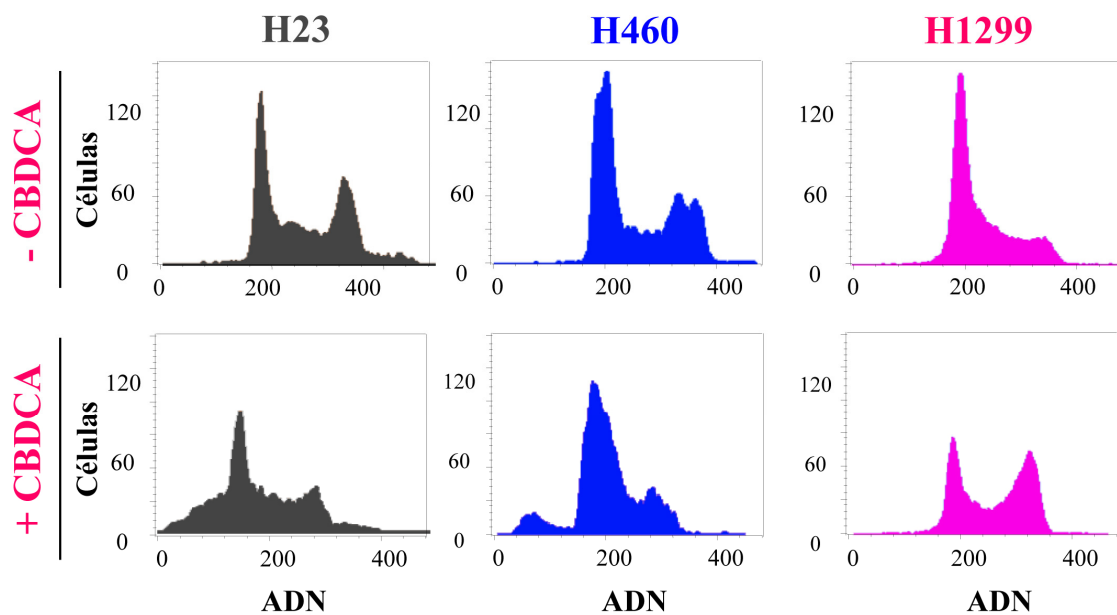


Figura 5: Viabilidad de las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta al tratamiento con carboplatino y cis-Platino. Se sembraron las tres líneas celulares y al día siguiente fueron tratadas con CBDCA (A) en una rango de concentraciones de 0-200 µg/ml, o con CDDP (B) con concentraciones de 0-100 µg/ml. Tras 72 horas de incubación se determinó el porcentaje de células viables mediante ensayo de cristal violeta. Los datos representan la media \pm S.D de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

mientras que las células H1299 presentan una gran resistencia a ambos compuestos respecto a las dos líneas celulares anteriores. En respuesta a CBDCA, las células H1299 presentan una IC_{50} cuatro veces mayor que las células H23 y H460 (Figura 5A), mientras que en respuesta a CDDP los valores de IC_{50} muestran una diferencia de aproximadamente un orden de magnitud (Figura 5B).

Para determinar si las diferencias observadas en la viabilidad celular en respuesta a CBDCA son debidas a muerte celular por apoptosis inducida por el fármaco, estudiamos el efecto de este agente quimioterápico sobre la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular de las tres líneas celulares, mediante tinción con ioduro de propidio en un ensayo de citometría de flujo. Para ello, se trataron las tres líneas celulares con CBDCA (125 μ g/ml) durante 24 horas y se analizó la progresión de sus correspondientes ciclos celulares. Como se muestra en la figura 6, observamos que el tratamiento con CBDCA produce un cambio en el perfil del ciclo celular de las tres líneas celulares. En las células sensibles H23 y H460 aparece



	H23		H460		H1299	
CBDCA (μ g/ml)	0	125	0	125	0	125
Apoptosis	0,6	18,54	4,9	10,08	1,98	1,76
G1	33,09	31,64	45,92	39,52	59,68	33,15
S	29,17	26,2	25,5	27,66	27,41	27,44
G2/M	32,97	18,73	23,38	23,04	11,22	37,87

Figura 6: Efecto del tratamiento con carboplatino sobre el ciclo celular de las líneas celulares de CNMP H23, H460 y H1299. Se sembraron las tres líneas celulares y al día siguiente fueron tratadas con 125 μ g/ml CBDCA. Tras 24 horas de incubación se analizó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran el perfil del ciclo celular en cada línea celular tras tratamiento con CBDCA. En la tabla se indica el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

un alto porcentaje de células apoptóticas en comparación con las células no tratadas, mientras que en la línea celular resistente H1299 se produce una acumulación de la población celular en la fase G2/M que no tiene lugar en las células control.

Estos resultados sugieren que la sensibilidad de las células H23 y H460 al tratamiento con CBDCA se correlaciona con la inducción de apoptosis, mientras que la resistencia presentada por las células H1299 a dicho fármaco podría deberse a un fuerte punto de control G2/M, que podría favorecer la reparación de las lesiones y posterior progresión de ciclo.

2.2. Rutas de muerte y supervivencia celular activadas por carboplatino en líneas celulares de CNMP.

Se ha demostrado que en la muerte celular inducida por CDDP están implicadas dos rutas pertenecientes a la familia de las MAPKs, JNK1/2 y p38, y la ruta de supervivencia NFκB (242-243). Basándonos en esto y en las diferencias observadas en la resistencia a los agentes antitumorales alquilantes estudiados en el apartado anterior, decidimos investigar las vías de muerte y supervivencia activadas por CBDCA y CDDP en cada línea celular, ya que éstas podrían ser las responsables de dichas diferencias en la respuesta al tratamiento con los agentes quimioterápicos.

2.2.1. Activación de las vías de las MAPKs en respuesta a tratamiento con carboplatino en células de CNMP.

Estudiamos en primer lugar las cinéticas de respuesta de los miembros de la familia MAPK (ERK1/2, JNK1/2 y p38), y los niveles de expresión de MKP1 en las líneas celulares de CNMP tras tratamiento con CBDCA, utilizando como control CDDP.

Como se muestra en la figura 7A, en respuesta a CBDCA, JNK1/2 y p38 se activan en las células H23 y H460 con una cinética tardía, siendo esta cinética de activación transitoria en las células H23 y persistente en las células H460. La activación de ERK1/2 también tiene lugar en ambas líneas celulares pero ocurre posteriormente a la activación de JNK1/2 y p38. En las células resistentes H1299, el tratamiento con CBDCA induce una débil activación basal de las tres MAPKs que aumenta con el tiempo y que al igual que en la línea celular H460, es una cinética persistente pero más tardía que en estas células. La activación de ERK1/2 en la línea celular resistente es mucho mayor que la que tiene lugar en las células sensibles H23 y H460, y que la activación de las quinasas de muerte JNK1/2 y p38 en las células H1299. Como se ha comentado en la introducción, la proteína MKP1 pertenece al grupo de fosfatasa duales inducibles, por lo que en condiciones basales las células normales no la expresan. Sin embargo,

las células tumorales H23 y H460 presentan altos niveles constitutivos de ella que disminuyen a niveles indetectables con el tiempo, correlacionándose con las cinéticas de activación de JNK1/2 y p38, que aumentan al tiempo que los niveles de MKP1 disminuyen. Las células H1299 no presentan niveles detectables de esta fosfatasa en condiciones basales ni tras estímulo con CBDCA. Como marcador apoptótico estudiamos la degradación proteolítica de la enzima PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), que es un sustrato directo de la caspasa-3. Durante la apoptosis, PARP es proteolizada por esta enzima en dos fragmentos inactivándola. Como se muestra en la figura 7A, en todas las líneas celulares se detecta la proteólisis de la enzima pero a un tiempo variable (12 horas en las líneas sensibles H23 y H460, y 24 horas para la línea resistente H1299), coincidiendo esta degradación proteolítica con el aumento de actividad de JNK1/2 y p38 y con la disminución de los niveles de expresión de MKP1.

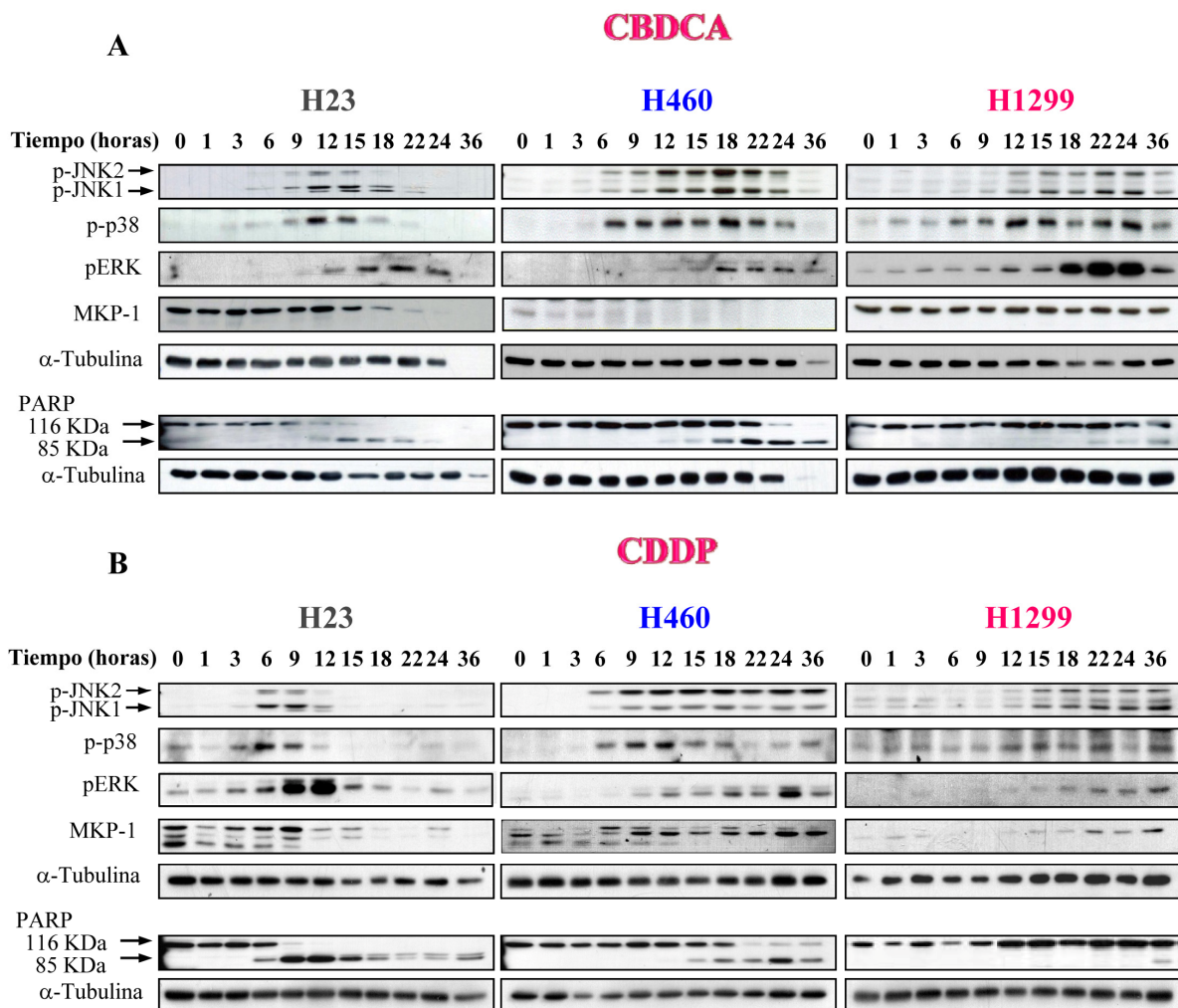


Figura 7: Cinéticas de activación de MAPKs y cambios en los niveles de MKP1 y PARP en las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta a carboplatino y cis-Platino. Las células H23, H460 y H1299 fueron tratadas con 600 µg/ml CBDCA (A) y 20 µg/ml CDDP (B) durante los periodos de tiempo indicados. Se obtuvieron los extractos proteicos celulares y se estudiaron mediante western blot los cambios en la fosforilación de JNK1/2, p38 y ERK1/2 y los niveles de las proteínas MKP1 y PARP. Como control de carga se utilizó α-Tubulina. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La figura 7B muestra que las cinéticas de activación de las tres quinasas de la familia MAPK (excepto la activación de ERK1/2 en las células H1299), la expresión de la fosfatasa MKP1 y la degradación proteolítica de PARP en respuesta a CDDP, tienen lugar en las tres líneas celulares de modo muy similar a lo ocurrido tras tratamiento con CBDCA pero con una cinética más temprana, resultando en un adelanto de aproximadamente 3-6 horas.

Estos resultados muestran que el CBDCA induce una fuerte activación de ERK1/2, quinasa relacionada con supervivencia celular, en las células resistentes H1299 que no tiene lugar en ninguna de las dos líneas celulares sensibles. También indican que este quimioterápico activa las mismas rutas de señalización relacionadas con muerte celular descritas para el CDDP con la única diferencia en la cinética de activación y que, por tanto, podría utilizar las mismas vías de inducción de apoptosis que el CDDP.

2.2.2. Quinasas implicadas en la activación de JNK1/2 y p38 por carboplatino en CNMP.

En general, la activación de JNK1/2 en respuesta a diversos estímulos tiene lugar a través de las quinasas SEK1/MKK4 y MKK7 que a su vez son activadas por la quinasa MEKK1 (56), mientras que en la activación de p38 intervienen las quinasas MKK3 y MKK6 que son activadas por la quinasa ASK1 (190).

En el grupo se había descrito con anterioridad que la activación de JNK1/2 en respuesta a tratamiento con CDDP tiene lugar mediante la activación de la vía MEKK1/SEK1 (243). Estudiamos si la activación de esta quinasa por CBDCA está mediada por la misma ruta o si intervienen otras quinasas. Para ello, realizamos ensayos de transfección transitoria en células 293T ya que la eficiencia de transfección en estas células es mucho mayor que la de las células de CNMP. Estudiamos el efecto de la expresión de los mutantes dominantes negativos de las quinasas MEKK1 (MEKK1 KR) y SEK1 (SEK1 KR) en la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA.

La figura 8A muestra que la expresión de MEKK1 sinergiza la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA, y que la expresión del dominante negativo, MEKK1 KR, previene esta activación de forma dependiente de dosis. Por otro lado, la expresión de SEK1 aumenta ligeramente la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA, mientras que la expresión de la forma mutante, SEK1 KR, no disminuye la activación por CBDCA de forma dependiente de dosis. Estos resultados nos sugieren que la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA implica a la quinasa MEKK1 pero no a SEK1. MKK7 es otra quinasa regulada por MEKK1 que interviene en la activación de JNK1/2, por lo que estudiamos si esta quinasa es la que media la activación de JNK1/2 por MEKK1 en respuesta a CBDCA. En la figura 8A vemos que la

expresión de MKK7 y su dominante negativo a diferentes dosis tienen un efecto similar sobre la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA. Esto sugiere que la quinasa MKK7 tampoco contribuye en la activación de JNK1/2 mediada por CBDCA.

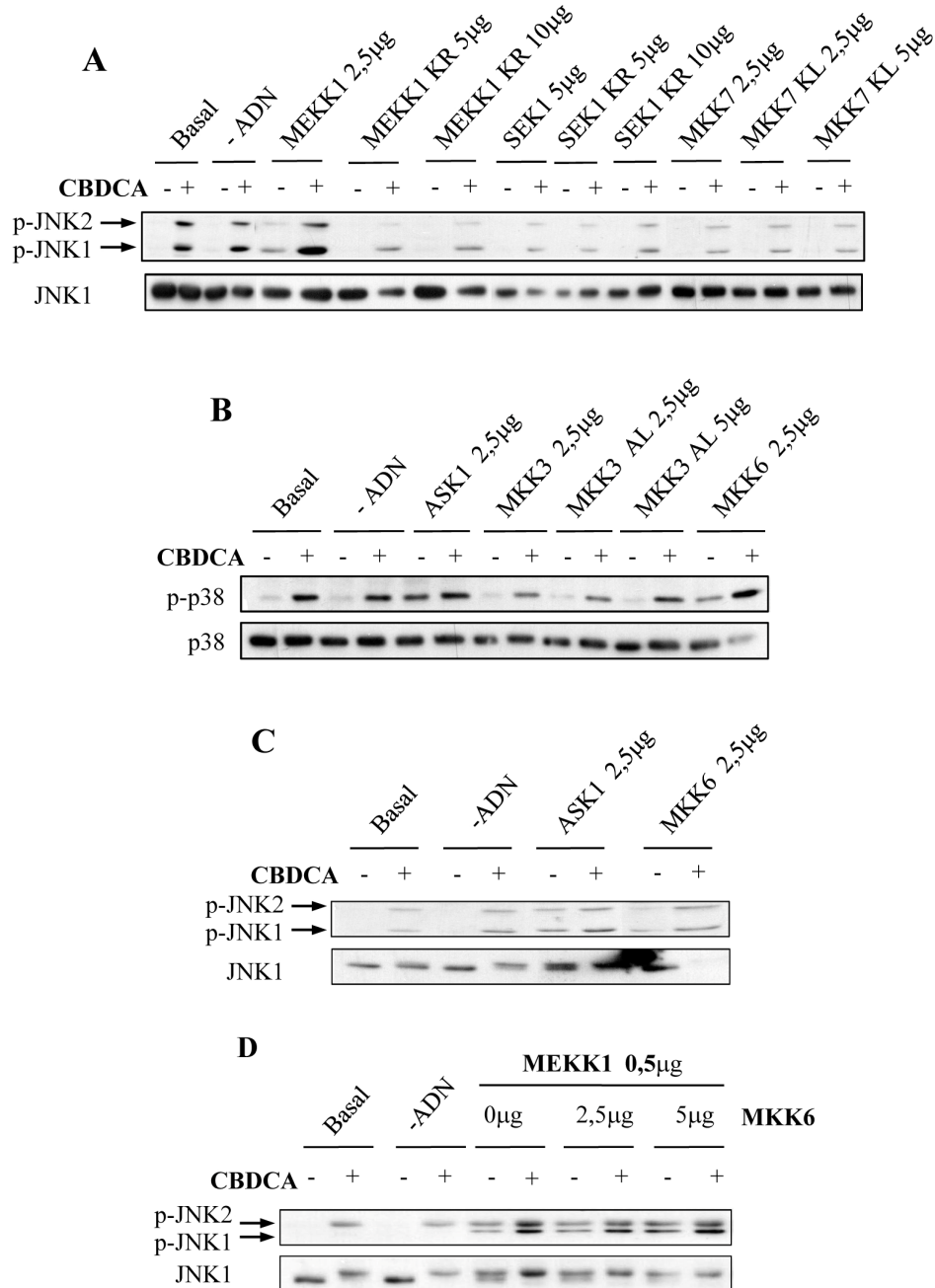


Figura 8: Efecto de la expresión de MEKK1, SEK1, MKK7, ASK1, MKK3 y MKK6 en la activación de JNK1/2 y p38 en respuesta a CBDCA en células 293T. Las células 293T fueron transfectadas transitoriamente con las cantidades indicadas de ADN que codifica para las formas normales o los dominantes negativos de las quinasas MEKK1, SEK1, MKK7 (A), ASK1, MKK3 y MKK6 (B) y (C); o co-transfectadas transitoriamente con las cantidades indicadas de ADN que codifica para las quinasas MEKK1 y MKK6 (D). Se privaron de suero las células durante 24 horas y se trataron con 600 µg/ml CBDCA durante 15 horas. Se obtuvieron los extractos proteicos celulares totales en los cuales se estudiaron mediante western blot los cambios en la fosforilación de JNK1/2 y p38. Como control de carga se utilizaron las formas no fosforiladas de JNK1 y p38. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Se ha demostrado que la activación de la quinasa ASK1 por CDDP produce la activación de dos subgrupos diferentes de MAPKK, SEK1/MKK4 y MKK3 y MKK6, que a su vez activan a JNK1/2 y p38 respectivamente (62). Estudiamos si en la activación de JNK1/2 y p38 tras tratamiento con CBDCA también intervienen estas quinasas. En la figura 8B se observa como la expresión de ASK1 aumenta ligeramente la activación de p38 en respuesta a CBDCA mientras que la expresión de MKK6 tiene un efecto sinérgico. En cambio, la expresión de MKK3 y su forma mutante, MKK3 AL, en diferentes dosis no parece regular la activación de esta quinasa. Por otro lado, en la figura 8C observamos que la expresión de ASK1 aumenta también ligeramente la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA, mientras que la expresión de MKK6 tiene un efecto mucho mayor sobre la activación de esta quinasa.

Se ha descrito que la activación de JNK1/2 y p38 por diferentes agentes puede tener lugar a través de activación cruzada entre sus MAPKKs y MAPKKs. Así, se ha demostrado que en respuesta a diversos estímulos la activación de p38 puede tener lugar también a través de MEKK1/MKK6 (297) y la de JNK1/2 a través de ASK1/MKK4 (27, 151). En base a los resultados anteriores decidimos investigar si la activación de JNK1/2 por CBDCA a través de MEKK1 podría estar mediada por MKK6. Para ello, hicimos un ensayo de co-transfección transitoria en células 293T y estudiamos el efecto de la co-expresión de MEKK1 a una dosis constante y de MKK6 a dosis crecientes en respuesta a CBDCA. En la figura 8D vemos que en ausencia de estímulo se produce una activación de JNK1/2 que es dependiente de dosis de MKK6, pero que tras tratamiento con CBDCA no hay cambios significativos en la activación de la quinasa dependiente de dosis, lo que indica que la activación de JNK1/2 mediada por MEKK1 tampoco tiene lugar a través de la quinasa MKK6.

Estos resultados sugieren que la activación de JNK1/2 en respuesta a CBDCA podría estar mediada por dos vías. Por un lado, MEKK1 podría estar mediando la activación de esta quinasa bien directamente o bien a través de SEK1 y MKK7 contribuyendo ambas quinasas por igual a la activación de JNK1/2, lo cual no descarta la participación de otras quinasas. Y por otro, esta activación podría tener lugar a través de la vía ASK1/MKK6; la cual a su vez, estaría mediando la activación de p38 en respuesta a CBDCA.

2.2.3. Activación de NFκB por carboplatino en células de CNMP.

NFκB es un factor de transcripción implicado en varios procesos celulares, entre ellos el crecimiento y supervivencia de células normales y tumorales. Como hemos comentado anteriormente, el CDDP induce la activación de la ruta de supervivencia NFκB. Con el objetivo de investigar si el tratamiento de las células de CNMP con CBDCA activa también la vía NFκB, utilizamos el gen reportero HIV-Luc que contiene los dos sitios de unión κB del promotor HIV

seguidos de un casete de expresión de luciferasa que permite medir la transcripción dependiente de NFκB.

En primer lugar estudiamos los niveles basales de transcripción dependientes de NFκB y tras estimulación con CBDCA mediante el ensayo de actividad luciferasa. En la figura 9 podemos observar que el tratamiento con CBDCA de las tres líneas celulares produce un aumento en la activación del factor de transcripción NFκB respecto a las células no tratadas. En ambos casos, la activación de la transcripción dependiente de NFκB es mucho mayor en las células resistentes H1299 que en las células sensibles H23 y H460.

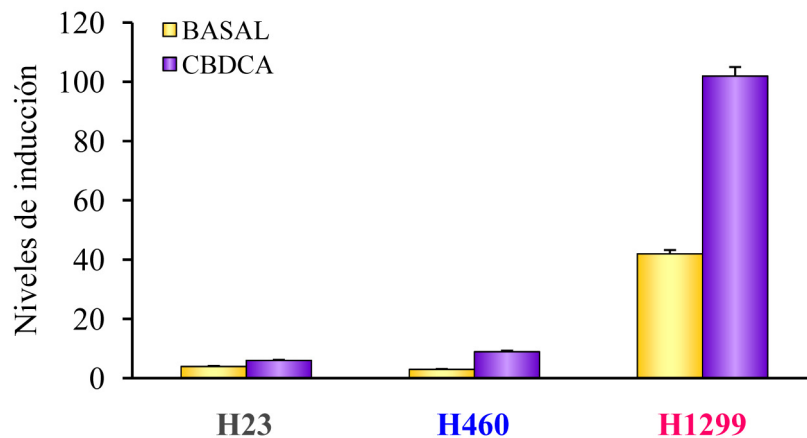


Figura 9: Actividad del factor de transcripción NFκB en las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta a CBDCA. Las células H23, H460 y H1299 fueron transfectadas con 0,1 µg del vector reportero (-453/-80) HIV-Luc por cada placa de 35-mm, se privaron de suero durante 24 horas y se trataron con 600 µg/ml CBDCA durante 12 horas. Se lisaron las células y se cuantificaron los cambios en los niveles de actividad luciferasa. Como control de transfección se utilizó el vector reportero CMV-Renilla. Los datos representan la relación entre unidades relativas de luciferasa de las células transfectadas con respecto a células no transfectadas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

En el grupo se demostró anteriormente que la activación de MEKK1 por CDDP induce la activación de NFκB, estando este proceso regulado por c-jun, el principal sustrato de la vía JNK1/2 (242). Decidimos investigar la implicación de MEKK1 en los cambios producidos en la transcripción dependiente de NFκB tras estimular con CBDCA las líneas celulares de CNMP y la participación en la misma de los diferentes componentes de la vía NFκB. Para ello, co-transfectamos las tres líneas celulares con el gen testigo HIV-Luc y plásmidos que expresan las distintas quinasas o los dominantes negativos de estos componentes. La figura 10 muestra que la expresión de la quinasa MEKK1 produce un gran aumento en la transcripción mediada por el factor de transcripción NFκB en condiciones basales, y un gran sinergismo en respuesta a CBDCA en las células H460 y H1299, siendo mayor en esta última, mientras que en las células H23 esta activación es aditiva.

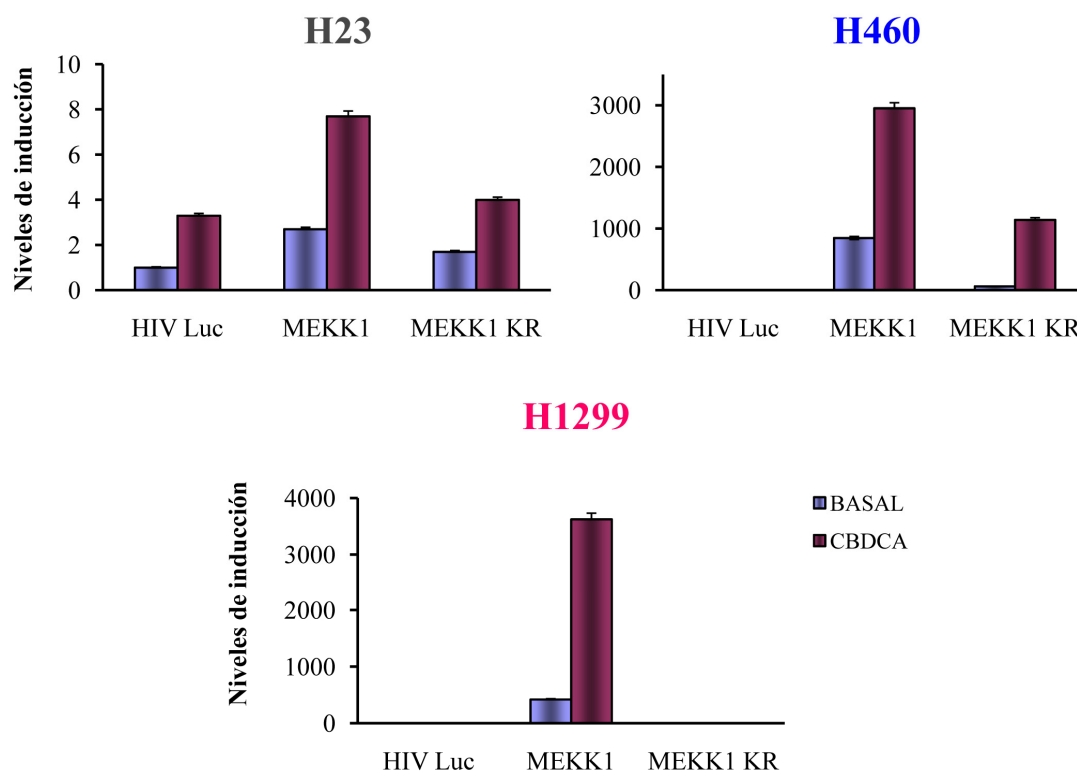


Figura 10: Efecto de la expresión de MEKK1 sobre la actividad del factor de transcripción NFκB en las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta a CBDCA. Las tres líneas celulares fueron co-transfectadas con 0,1 µg del vector reportero (-453/-80) HIV-Luc o con 0,1 µg del vector reportero (-453/-80) HIV-Luc y 1 µg del vector MEKK1 o MEKK1 KR. La actividad luciferasa se determinó como en la figura 9. Los datos representan la relación entre unidades relativas de luciferasa de las células transfectadas con respecto a células no transfectadas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

En la vía canónica, la mayoría de los estímulos que activan NFκB lo hacen regulando la actividad del complejo IκB quinasa (IKK), el cual está formado por tres subunidades: IKKα, IKKβ y el modulador esencial de NFκB (NEMO/IKKγ). IKKα e IKKβ tienen actividad catalítica, mientras que NEMO actúa como un componente regulatorio del complejo. Estudiamos la participación de las subunidades IKKα e IKKβ en los cambios producidos en la transcripción dependiente de NFκB tras estimular con CBDCA las líneas celulares de CNMP. Observamos que la expresión de la quinasa Ikkα (Figura 11A) tiene un efecto aditivo en la transcripción dependiente de NFκB en las células H1299 y H460, siendo mayor en las primeras, mientras que en la línea celular H23 el efecto es sinérgico. En cambio, la expresión de la proteína IKKβ produce un aumento en la activación del factor de transcripción NFκB en respuesta a CBDCA en las células H23 y H460, y un gran sinergismo en las células H1299 (Figura 11B). En todos los casos, la expresión de los dominantes negativos de cada quinasa da lugar a una disminución de la transcripción dependiente de NFκB respecto a la correspondiente proteína no mutada.

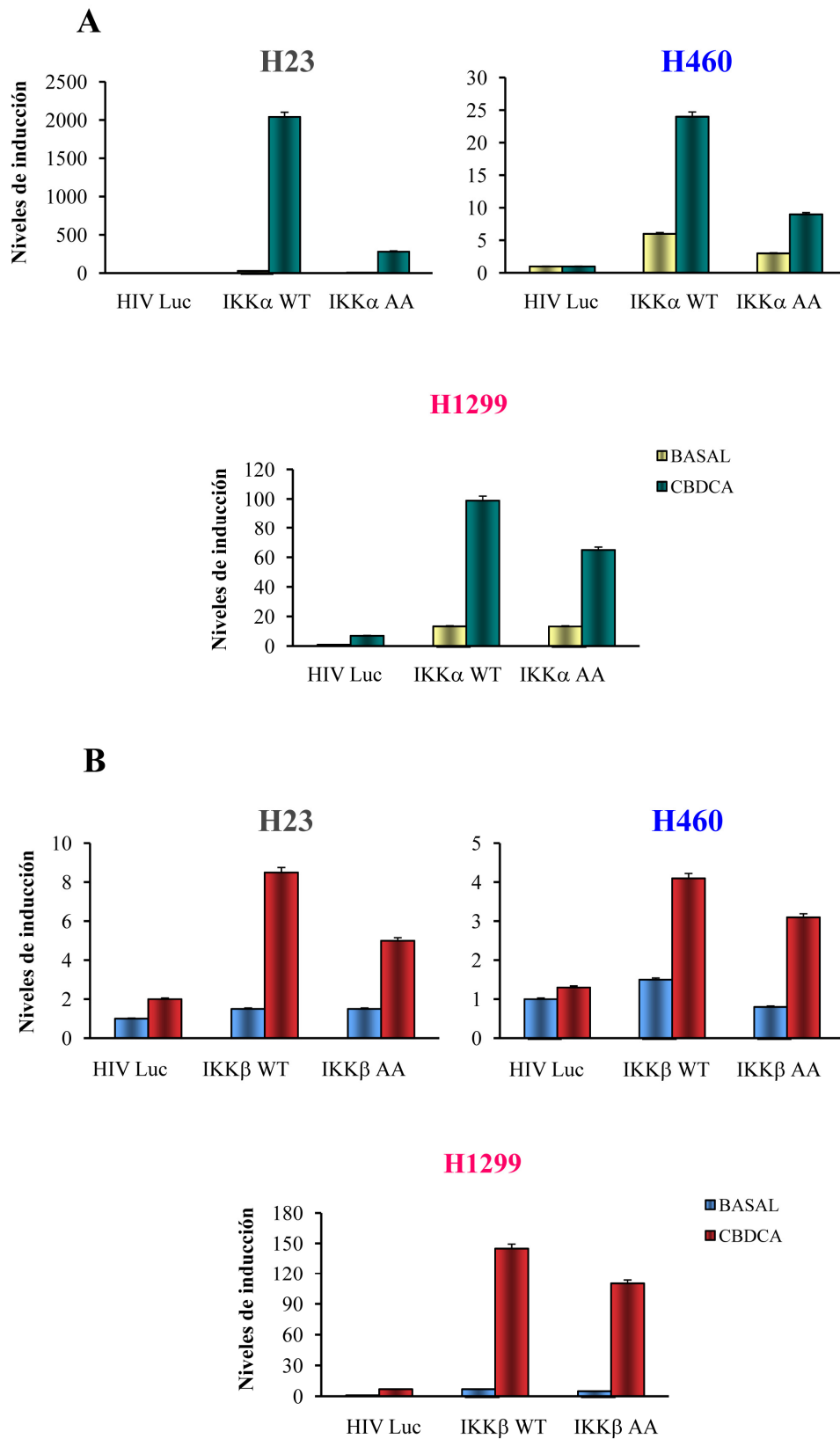


Figura 11: Efecto de la expresión de IKK α e IKK β sobre la actividad del factor de transcripción NF κ B en las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta a CBDCA. Las tres líneas celulares fueron co-transfectadas con 0,1 μ g del vector reportero (-453/-80) HIV-Luc o con 0,1 μ g del vector reportero (-453/-80) HIV-Luc y 1 μ g del vector IKK α WT o IKK α AA (**A**) e IKK β WT o IKK β AA (**B**). La actividad luciferasa se determinó como en la figura 9. Los datos representan la relación entre unidades relativas de luciferasa de las células transfectadas con respecto a células no transfectadas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La subunidad p65 es uno de los miembros mayoritarios que forman parte del complejo NF κ B implicados en esta ruta de supervivencia. Su activación tiene lugar, entre otros mecanismos, por la fosforilación del dominio de transactivación (TAD). Para investigar su papel dentro del proceso de activación de NF κ B en respuesta al tratamiento con CBDCA utilizamos un plásmido que expresa la proteína de fusión Gal4-p65, en la que las secuencias que codifican el dominio de unión al ADN de Gal4 están unidas a las secuencias que codifican el dominio de transactivación 1 (TAD1) de p65. Observamos un gran sinergismo en la activación transcripcional en respuesta a CBDCA en las células H23 respecto a las H460, y muchísimo mayor aún en las células H1299 (Figura 12). Esto indica que en estas líneas celulares en respuesta a CBDCA p65 se activa también por fosforilación además de por translocación al núcleo.

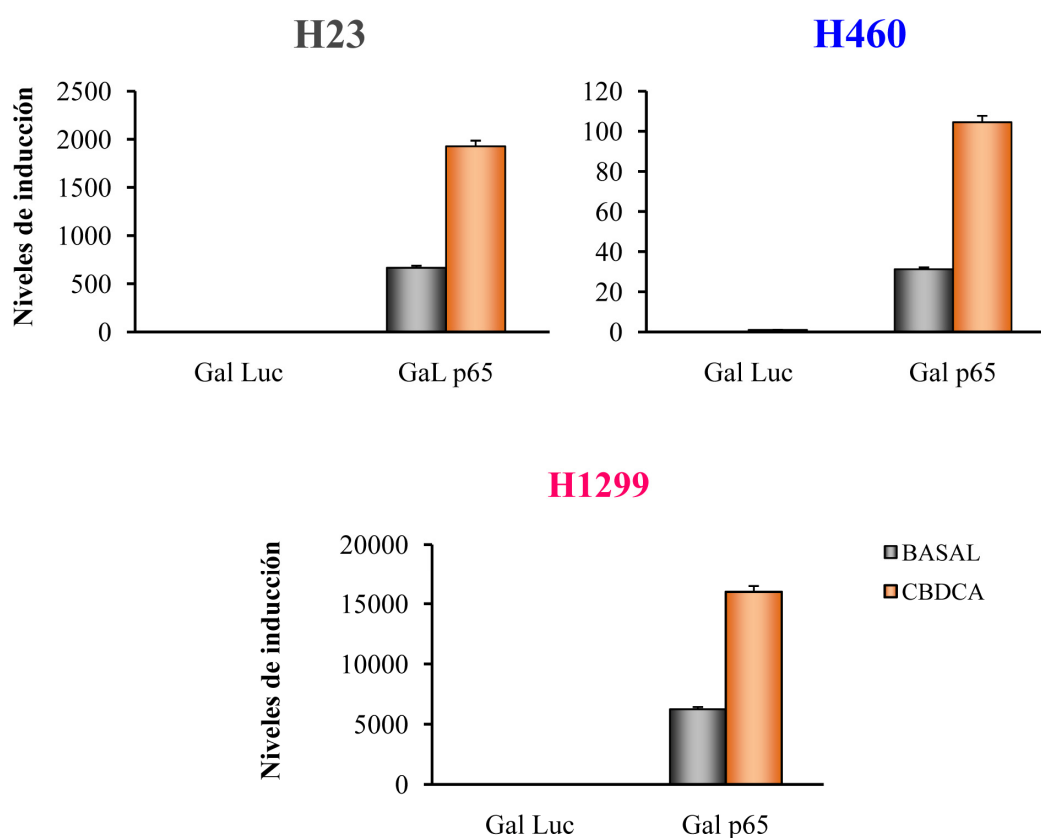


Figura 12: Estudio de la activación de p65 en las células de CNMP H23, H460 y H1299 en respuesta a CBDCA. Las células H23, H460 y H1299 fueron co-transfectadas con 0,2 μ g del vector reportero 5X-Gal4-Luc o con 0,2 μ g del vector reportero 5X-Gal4-Luc y 0,5 μ g del vector Gal4-p65. La actividad luciferasa se determinó como en la figura 9. Los datos representan la relación entre unidades relativas de luciferasa de las células transfectadas con respecto a células no transfectadas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

El conjunto de estos resultados muestra que el tratamiento con CBDCA de la línea celular resistente H1299, produce la activación de NFκB a través de Ikkα e Ikkβ, es decir, de la vía canónica que es la vía relacionada con supervivencia celular. Mientras que en las líneas más sensibles, H23 y H460, esta activación tiene lugar principalmente mediante la vía no canónica (Ikkα), la cual está relacionada con diferenciación celular. A pesar de ello, los niveles de activación de la subunidad p65 son relativamente altos en las células H23. Esto podría deberse a la participación de mecanismos alternativos que impliquen la estimulación de la transactivación de la subunidad p65 de NFκB.

Finalmente, basándonos en la gran diferencia observada en los niveles de actividad de NFκB tanto en condiciones basales como tras tratamiento con CBDCA en las células H1299 respecto a las células H23 y H460, quisimos estudiar si la estimulación con este fármaco de las células H1299 promueve una translocación nuclear de complejos NFκB más eficiente que en las otras dos líneas celulares.

Para ello, tratamos las tres líneas celulares con CBDCA y llevamos a cabo un ensayo de retraso en la movilidad electroforética en gel (EMSA) con los extractos nucleares. Como se muestra en la figura 13, las células H460 no muestran prácticamente translocación nuclear de NFκB ni a nivel basal ni tras estimulación con CBDCA, mientras que en las células H23 y H1299 existe una pequeña translocación basal del factor de transcripción que aumenta con el tiempo, alcanzando el máximo de activación a 1 hora en las células H23 y a los 30 minutos en las células H1299, y que vuelve a disminuir en los tiempos posteriores. Observamos niveles similares del oligonucleótido control Oct-1 en las diferentes muestras (Figura 13), lo que confirma que las diferencias observadas en la actividad NFκB no se deben a diferencias en la integridad de los extractos nucleares utilizados en este experimento.

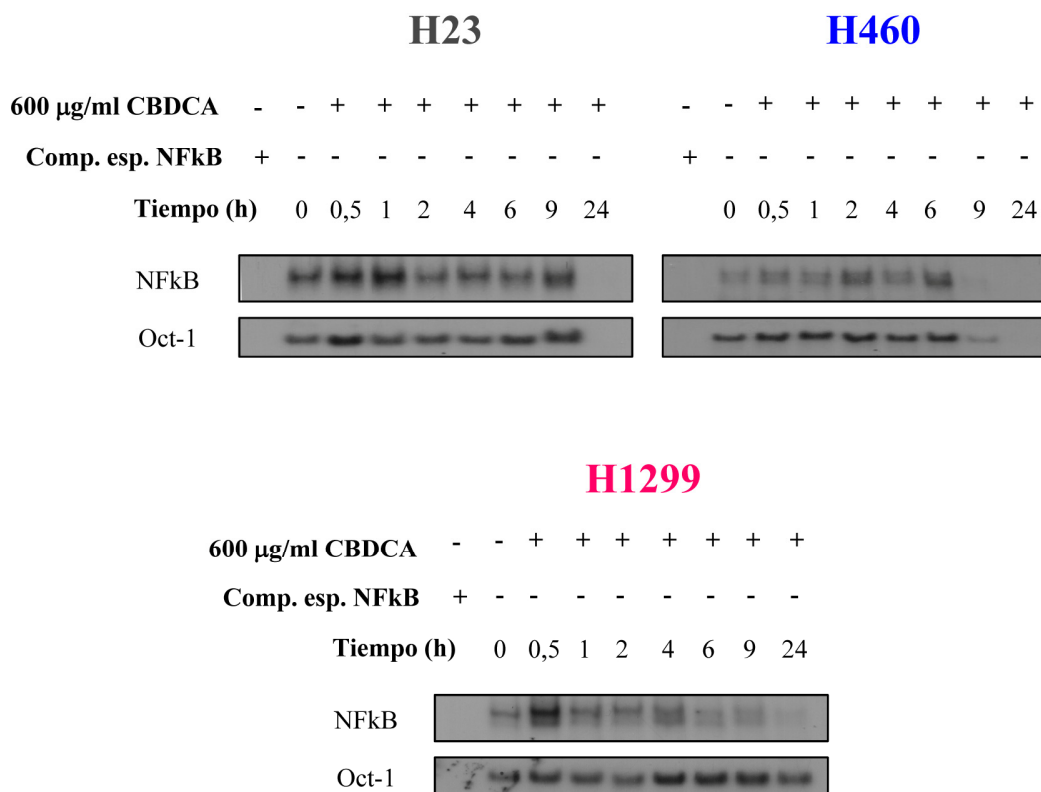


Figura 13: Activación de NFκB por CBDCA en células de CNMP H23, H460 y H1299. Las células H23, H460 y H1299 fueron tratadas con 600 µg/ml CBDCA durante los periodos de tiempo indicados. Los extractos nucleares se incubaron con las sondas: específica NFκB e inespecífica Oct-1 marcadas radiactivamente. Los complejos ADN-proteína se separaron por electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Con la finalidad de identificar los complejos de la familia NFκB que intervienen en la translocación nuclear tras tratamiento con CBDCA, hicimos un ensayo de retardo en gel utilizando anticuerpos específicos de p65, RelB y p50, (EMSA supershift), que compiten con las diferentes subunidades de los complejos NFκB por los sitios de unión al ADN. En el panel superior de la figura 14 podemos ver un retraso en la movilidad cuando competimos con anticuerpos específicos de p65 o de p50 en las células H23 y H1299. En los paneles inferiores se observa translocación nuclear de Oct-1 en ambas líneas celulares, lo que confirma que no se ha perdido la integridad de los extractos nucleares utilizados en este experimento. Estos datos sugieren que los complejos mayoritarios formados en las líneas celulares H23 y H1299 en respuesta a tratamiento con CBDCA serían p50/p65.

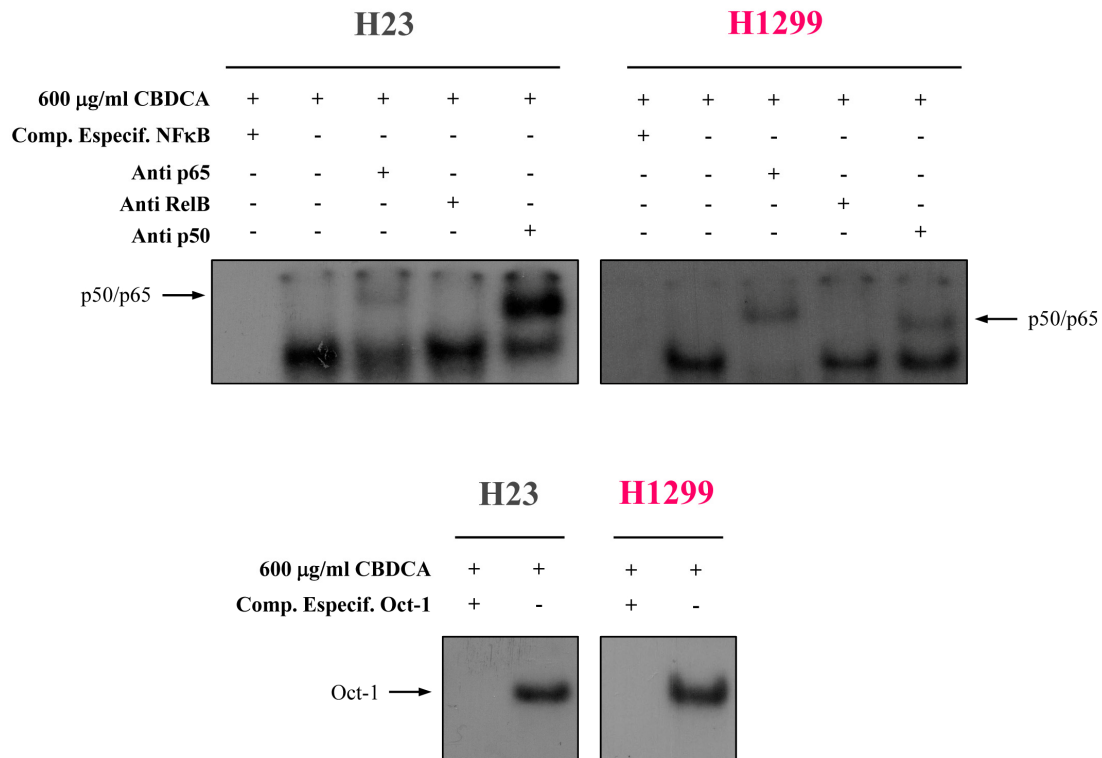


Figura 14: Complejos de la familia de NFκB que participan en la respuesta al tratamiento con CBDCA en células de CNMP H23 y H1299. Las células H23 y H1299 fueron tratadas con 600 µg/ml CBDCA durante 1 hora y 30 minutos respectivamente. Se obtuvieron los extractos nucleares y se incubaron con anticuerpos específicos de p65, RelB y p50 (panel superior) o con las sonda inespecífica Oct-1 marcada radiactivamente. Los complejos ADN-proteína se separaron por electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida. La flecha indica la posición de los complejos NFκB-ADN formados por los dímeros p50/p65 (panel superior) y del oligonucleótido control Oct-1 (panel inferior). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Para comprobar si esto es cierto, estudiamos *in vivo* la translocación al núcleo de p65 y RelB tras estimulación con CBDCA en las células H1299 mediante un ensayo de inmunofluorescencia. El resultado se muestra en la figura 15 donde observamos una clara translocación de p65 al núcleo que comienza a los 30 minutos y se intensifica a las 4 horas, mientras que en el caso de RelB sólo se apreciaba una sutil translocación a tiempos tardíos (4 horas). Hicimos el mismo experimento en las células H23 y obtuvimos un resultado similar (datos no mostrados). Estos resultados corroboran la formación de complejos mayoritariamente formados por p50/p65 en respuesta a CBDCA en ambas líneas celulares.

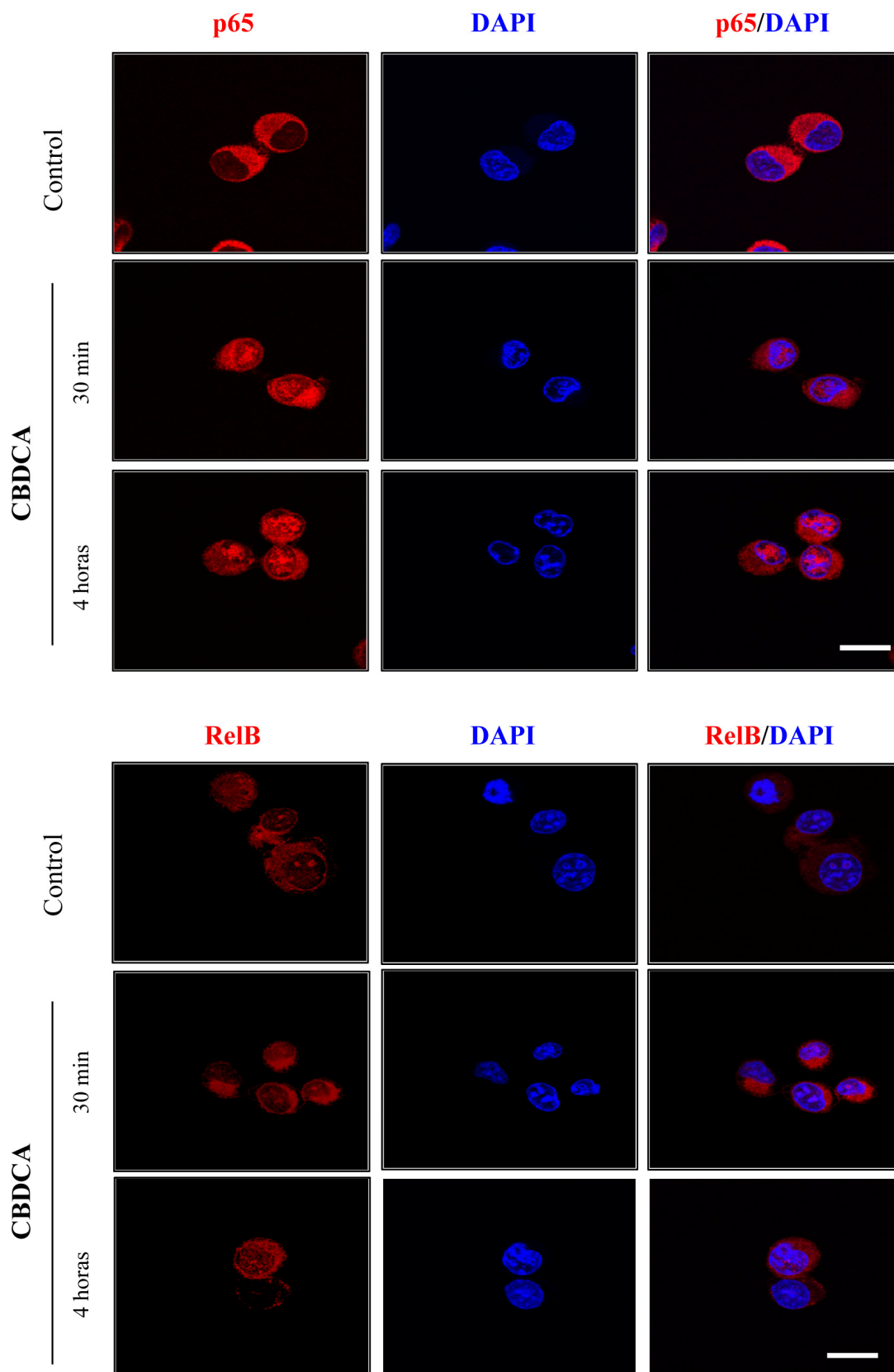


Figura 15: Complejos de la familia de NF κ B que participan en la respuesta al tratamiento con CBDCA en células de CNMP H23 y H1299. Imágenes representativas que muestran la localización de p65 (panel superior) y RelB (panel inferior) en las células H1299 tratadas con CBDCA (600 μ g/ml) a los tiempos indicados. Las células se tiñeron con anti-p65 y anti-RelB y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Escala 20 μ m.

3. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES CON EXPRESIÓN INDUCIBLE DEL ONCOGÉN K-Ras.

Hay diversos trabajos en la literatura que correlacionan a MKP1 con la tumorogénesis y progresión tumoral de pulmón. Se ha observado la expresión de elevados niveles nucleares de MKP1 en biopsias y líneas celulares derivadas de CNMP (60, 286), y se ha descrito una expresión constitutiva de esta fosfatasa en tumores de CNMP comparado con tejido normal (172). El adenocarcinoma de pulmón es, junto con el carcinoma escamoso, el más frecuente de todos los tipos de tumores pulmonares y presenta múltiples anormalidades citogenéticas y moleculares, encontrándose en aproximadamente el 30% de estos tumores la mutación activante del oncogén K-Ras. K-Ras es una proteína GTPasa de membrana que regula diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de esta proteína dan lugar a una proteína que no responde a regulación negativa por la GTPasa GAP y por tanto, mantiene una señalización constitutiva. En ratones, se han encontrado mutaciones K-Ras en más del 90% de tumores de pulmón espontáneos e inducidos químicamente.

Con el objetivo de estudiar el papel de MKP1 en la carcinogénesis y progresión tumoral de pulmón en unas condiciones en las que el oncogén K-Ras está mutado *in vivo*, decidimos utilizar el modelo transgénico K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}, en el que los ratones modificados genéticamente portan un alelo mutado del gen K-Ras, cuya expresión es inducible por exposición a esteroides sintéticos; y otro modelo transgénico en el que los ratones modificados genéticamente portan los dos alelos del gen *mkp1* mutado. De modo que cruzando ambas líneas transgénicas obtenemos un modelo murino en el que los ratones no expresan la fosfatasa MKP1, y la expresión del oncogén K-Ras está dirigida a un subconjunto específico de las células epiteliales del pulmón y es inducible por el esteroide sintético 4-Hidroxitamoxifeno (4-OHT). Este modelo transgénico nos permite examinar el papel de MKP1 en la iniciación y progresión de tumores de pulmón que tienen mutado el oncogén K-Ras *in vivo*.

3.1. Estudio del papel de MKP1 en la aparición y desarrollo de tumores de pulmón en ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{-/-}.

Para determinar el efecto de la ausencia de MKP1 en la formación y desarrollo de tumores de pulmón inducidos por K-Ras, seleccionamos grupos de ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{+/+}, K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{-/-}, K-Ras^{+V12}; RERT^{+/-}; *mkp1*^{+/-}, K-Ras^{+/+}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{+/+} y K-Ras^{+/+}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{-/-} de ambos sexos. Estos animales fueron inyectados intraperitonealmente con 500 µg de 4-OHT a los 2-3 meses de edad y sacrificados 8 meses después. El análisis post-mortem reveló que los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; *mkp1*^{+/+} habían

desarrollado un número de tumores de pulmón mucho mayor que los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/-} (Figura 16). Los ratones K-Ras^{+/-}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/-} y K-Ras^{+/-}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} no desarrollaron ningún tumor y se utilizaron como control de que las lesiones desarrolladas por los ratones de estudio eran debidas a la activación del oncogén K-Ras y no a otra causa. Además, los ratones K-Ras^{+/-}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} permiten discriminar posibles efectos específicos como consecuencia de la inactivación de este gen.

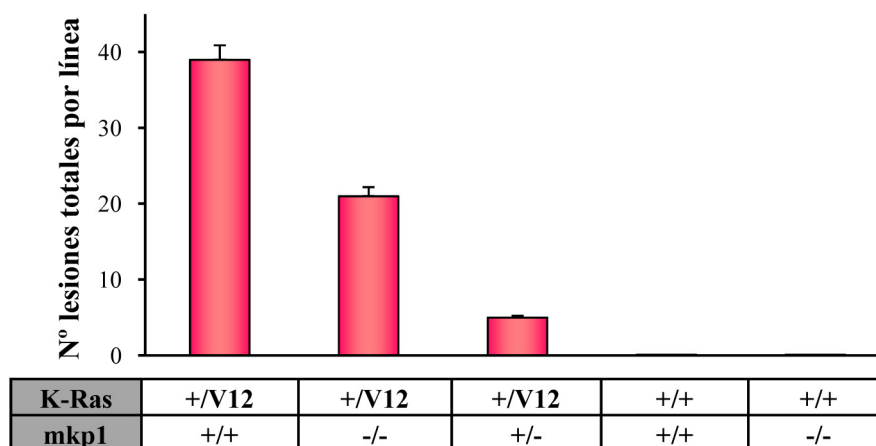


Figura 16: Inducción de tumores de pulmón en ratones mkp1^{+/-} y mkp1^{-/-} que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. Los ratones mkp1^{+/-} y mkp1^{-/-} fueron cruzados con ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert} y a los 2-3 meses de edad se les inyectó intraperitonealmente 500 µg de 4-OHT. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después y se cuantificó la tumorigénesis inducida por K-Ras^{V12} en los pulmones de los ratones mkp1^{+/-} y mkp1^{-/-}. Todos los ratones portan el knock-in RERT^{+ert}. En la gráfica se representa la media ± S.D de K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/-}: n=5; K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-}: n=7; K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/-}: n=2; K-Ras^{+/-}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/-}: n=2 y K-Ras^{+/-}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-}: n=2.

La introducción de un casete reportero IRES-β-geo en el extremo 3'UTR del locus del oncogén K-Ras4B nos permitió monitorizar la expresión de alelo oncogénico mediante tinción específica de LacZ con X-Gal. El análisis por tinción de X-Gal de las secciones obtenidas a partir de los pulmones de los ratones utilizados en el experimento, mostró que como consecuencia del tratamiento con 4-OHT todos los pulmones de los ratones K-Ras^{+V12} presentaban grupos de células que expresaban el marcador LacZ (células β-geo+) mientras que los pulmones de los ratones que no expresaban el oncogén no presentaban tinción para dicho marcador (Figura 17). Esto indica que el hecho de que los ratones mkp1^{-/-} desarrollen menos tumores que los ratones mkp1^{+/-} no es debido a que el oncogén K-Ras no esté expresado sino a la ausencia de la fosfatasa MKP1.

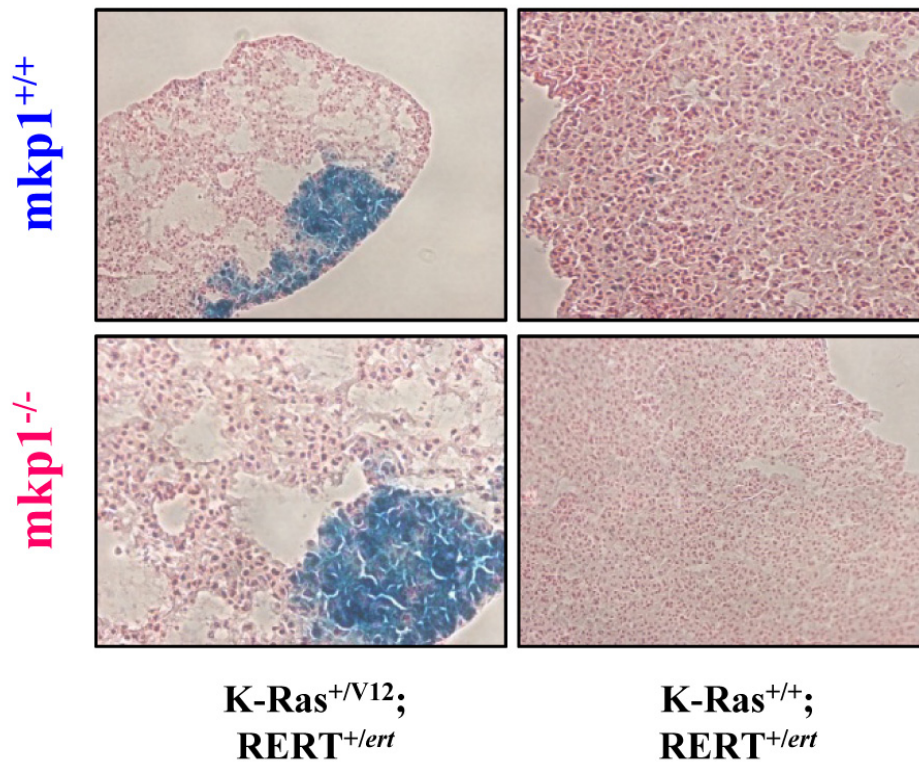


Figura 17: Expresión de células β -geo⁺ en los pulmones de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan o no el oncogén K-Ras^{V12}. Imágenes representativas de la expresión del marcador LacZ en pulmones de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan o no el oncogén K-Ras mediante tinción con X-Gal. Las imágenes son representativas de al menos 5 ratones de cada genotipo. Aumento x10.

La figura 18 muestra que el tamaño y número de los grupos de células β -geo⁺ presentes en los pulmones de los ratones que no expresan MKP1 es menor que en los que expresan la fosfatasa. En las imágenes del panel superior se observa que en los pulmones de los ratones que expresan MKP1 además de adenomas (A y B), adenocarcinomas (C, D y E) e hiperplasias (F y áreas de A, de B, de D y de E), existen células aisladas o pequeños grupos de células que expresan el oncogén K-Ras y que no muestran signos de alteración o de transformación. Sin embargo, las imágenes del panel inferior muestran que en las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones $mkp1^{-/-}$, las células β -geo⁺ se expresan en los adenomas (G), adenocarcinomas (H) e hiperplasias (I, K y L), siendo prácticamente imposible encontrar alguna célula que exprese tinción de X-Gal en zonas fuera de dichas lesiones. Esto indica que la ausencia de MKP1 puede estar comprometiendo la supervivencia y/o progresión de las células que portan la mutación oncogénica K-Ras^{V12}.

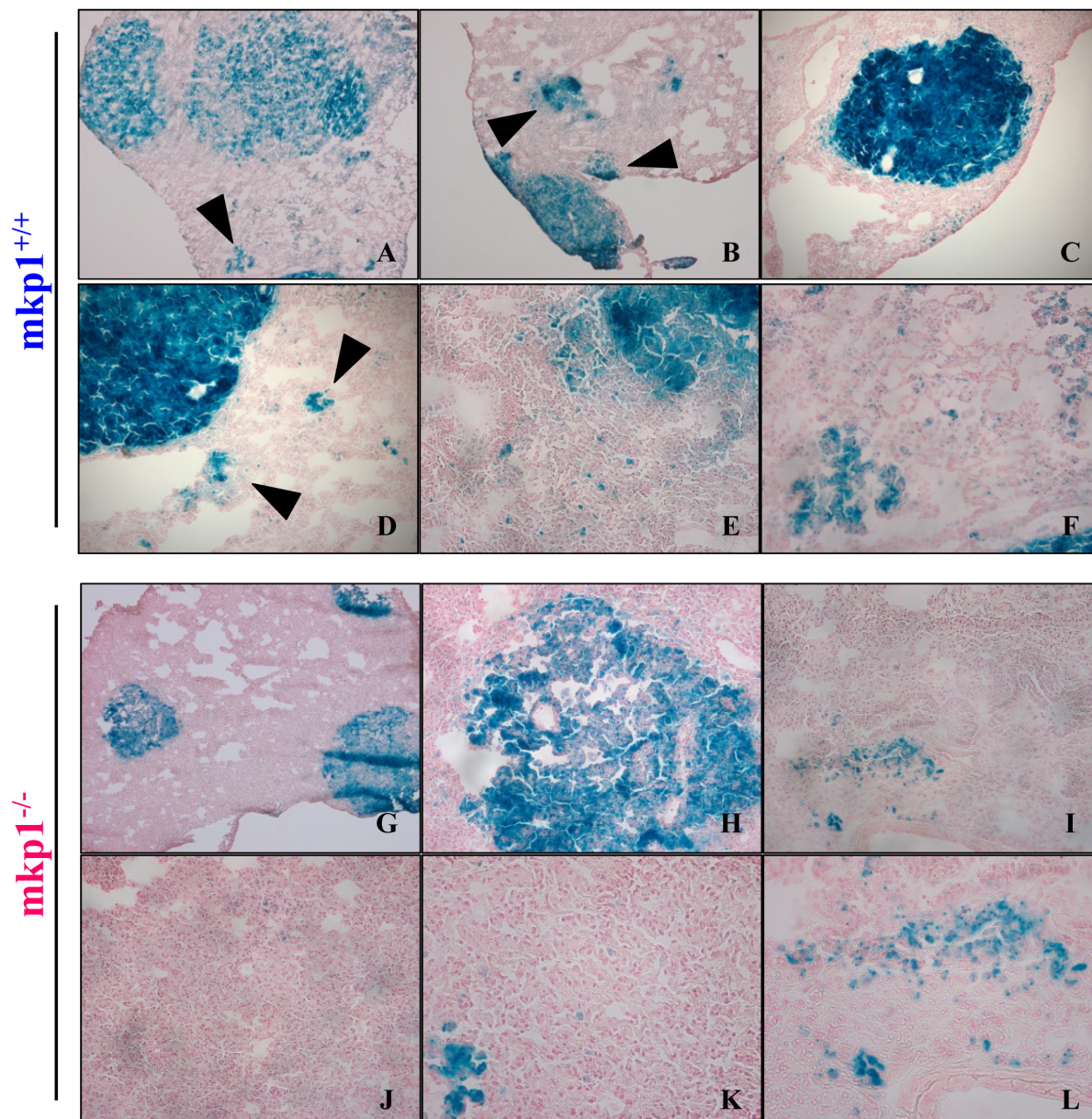


Figura 18: Expresión de células β -geo⁺ en los pulmones de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. Imágenes representativas de la expresión del marcador LacZ en pulmones de ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/+}$ y K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{-/-}$ mediante tinción con X-Gal. **A, B y G:** adenomas; **C, D, E y H:** adenocarcinomas; **F, I, K y L:** hiperplasias; **J:** área sin prácticamente expresión detectable del oncogén K-Ras. Las flechas negras indican la presencia de hiperplasias. **F y L:** áreas magnificadas de las imágenes A e I respectivamente. Las imágenes son representativas de al menos 5 ratones de cada genotipo. Aumentos: **A, B y G** x5; **C y D** x10; **E, F, H, I y J** x20; **K y L** x40.

Que el porcentaje de células que expresan el marcador LacZ sea pequeño en los ratones de ambos genotipos también indica que la activación del oncogén K-Ras ha tenido lugar en un número reducido de células, lo que es importante ya que mimetiza la realidad de un proceso tumorogénico humano donde el proceso tumoral se inicia por mutación de una única célula que da lugar a un tumor el cual, con el tiempo, podrá metastatizar a otros tejidos.

El estudio histopatológico de los pulmones de los ratones empleados en el experimento mostró un amplio espectro de lesiones pulmonares que van desde hiperplasias a adenomas y adenocarcinomas de pulmón de diferente grado (Figura 19).

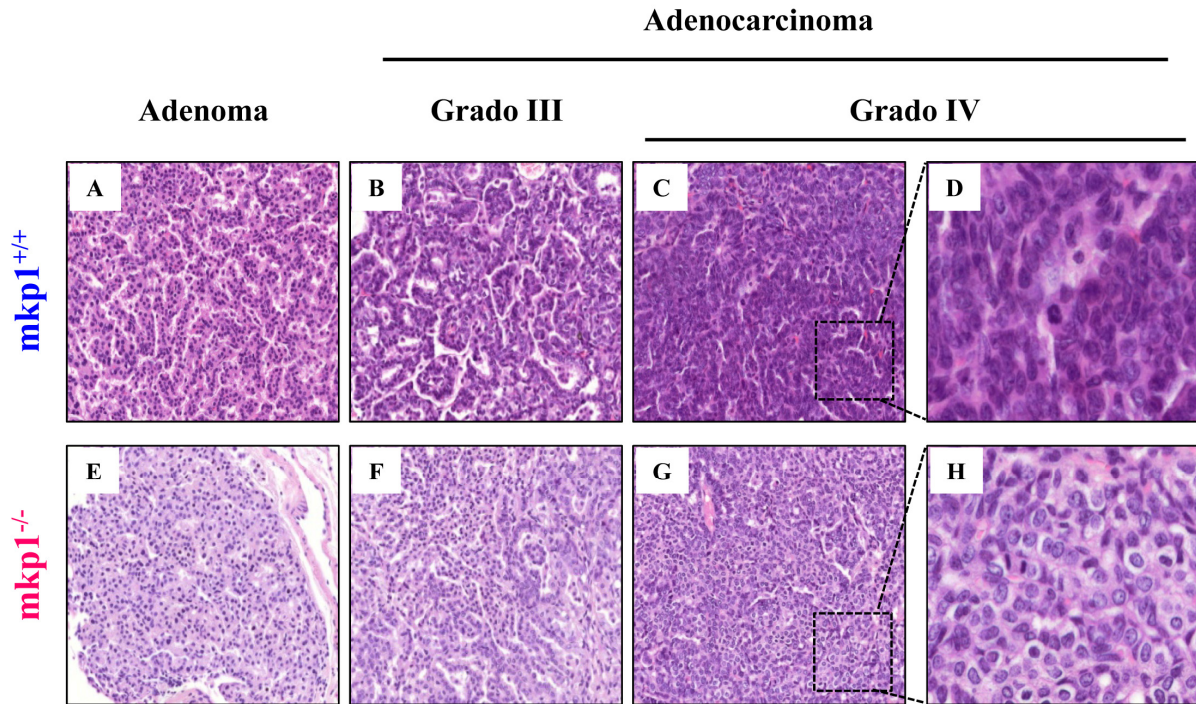


Figura 19: Imágenes representativas de las diferentes lesiones desarrolladas en los pulmones de ratones **mkp1^{+/+}** y **mkp1^{-/-}** que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. Todos los ratones portan el alelo mutante K-RasV12 en el gen K-Ras y el knock-in RERT^{+/ert}. **A y E:** adenomas. **B y F:** adenocarcinomas de grado III. **C y G:** adenocarcinomas de grado IV. **D y H:** magnificación del área resaltada en las figuras C y D respectivamente, mostrando la presencia de mitosis. Las imágenes son representativas de al menos 5 ratones de cada genotipo. Aumentos: **A, B, C, E, F y G** x20. **D y H** x63.

La figura 20 muestra que la ausencia de MKP1 disminuye el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas pulmonares iniciados por K-Ras, ya que el porcentaje de lesiones de grado II (adenomas), grado III y grado IV (adenocarcinomas) es mucho mayor en los ratones **mkp1^{+/+}** que expresan el oncogén K-Ras, que en los que no expresan la fosfatasa.

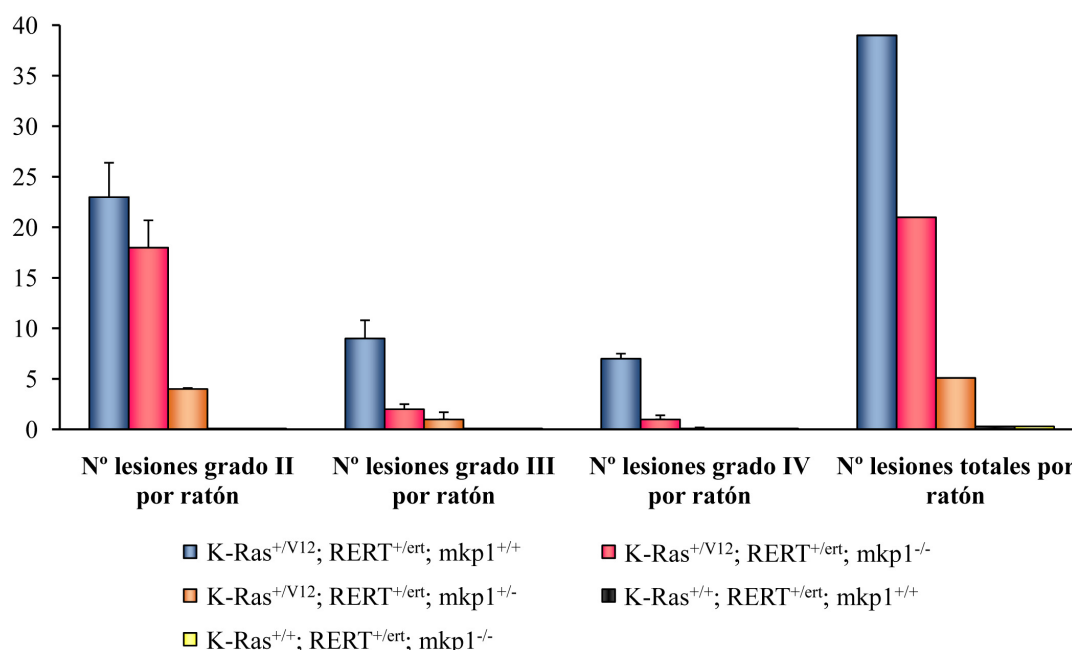


Figura 20: Clasificación tumoral de las lesiones desarrolladas en los pulmones de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. La clasificación tumoral en cada animal de la figura 16 se estableció como: grado II, adenoma; grado III y grado IV, adenocarcinoma. K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/+}$: n=5; K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{-/-}$: n=7; K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/-}$: n=2; K-Ras^{+/+}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/+}$: n=2 y K-Ras^{+/+}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{-/-}$: n=2.

Estos resultados sugieren que MKP1 es un importante regulador positivo de la tumorigénesis de pulmón inducida por K-Ras.

3.2. Análisis inmunohistoquímico de los patrones de expresión asociados a la ausencia de MKP1 en las lesiones pulmonares inducidas por el oncogén K-Ras.

El estudio de la naturaleza celular de las diferentes lesiones pulmonares desarrolladas por los ratones K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/+}$ y K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{-/-}$ se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas empleando los anticuerpos policlonales anti-SPC (marcador específico de neumocitos tipo II) y anti-CC10 (marcador específico de células bronquiales de Clara), en el análisis de cortes seriados de diferentes lesiones pulmonares. Todos los adenomas y adenocarcinomas desarrollados en los pulmones de los ratones K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{+/+}$ y K-Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; $mkp1^{-/-}$ analizados fueron positivos para SPC y negativos para CC10, no existiendo diferencias en el patrón de expresión entre ambos genotipos (Figura 21).

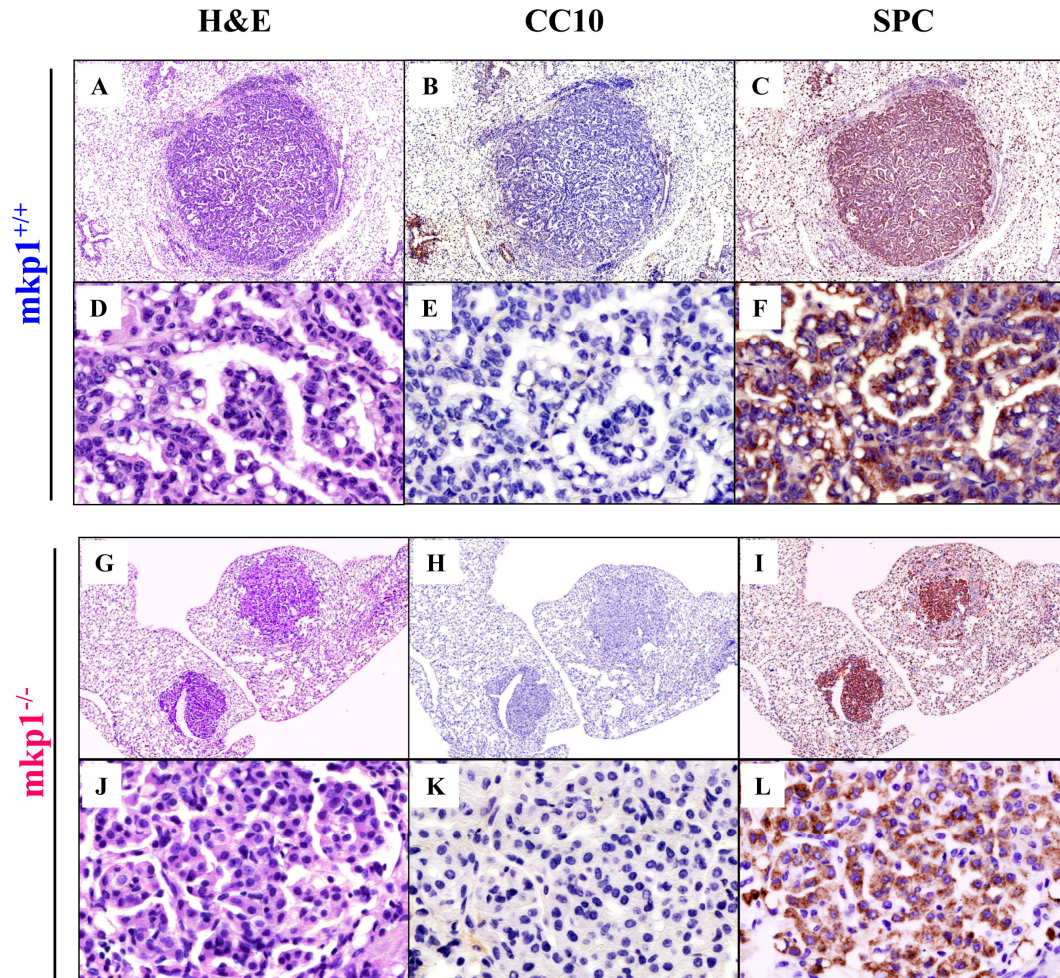


Figura 21: Análisis inmunohistoquímico de los patrones de expresión asociados a la ausencia de MKP1 en las lesiones pulmonares inducidas por el oncogén K-ras. Se estudió la naturaleza celular de las lesiones pulmonares desarrolladas en los ratones de la figura 16 mediante la expresión de marcadores celulares por técnicas de inmunohistoquímica. Todos los ratones portan el alelo mutante K-RasV12 en el gen K-Ras y el knock-in RERT^{+/ert}. **A, D, G y J:** tinción para hematoxilina-eosina. **B, E, H y K:** tinción para CC10. **C, F, I y L:** tinción para SPC. Las imágenes son representativas de al menos 5 ratones de cada genotipo. Aumentos: **A, B, C, G, H e I** x4. **D, E, F, J, K y L** x40. H&E: hematoxilina-eosina.

La figura 22 muestra el patrón de expresión de CC10 y SPC en los pulmones del ratón K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-} de la figura 21. En la figura se observa que la tinción es CC10 positiva y SPC negativa en los bronquiolos (flechas negras), mientras que en los alveolos la expresión es negativa para CC10 y positiva para SPC (flechas blancas). Esto indica que la no expresión del marcador CC10 en las lesiones desarrolladas en los pulmones del ratón K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-} de la figura 21 no se debe a un fallo en el proceso de tinción de la muestra sino a la propia ausencia de expresión de dicho marcador. Además, la ausencia de MKP1 no parece alterar la naturaleza de ninguno de los tipos celulares estudiados.

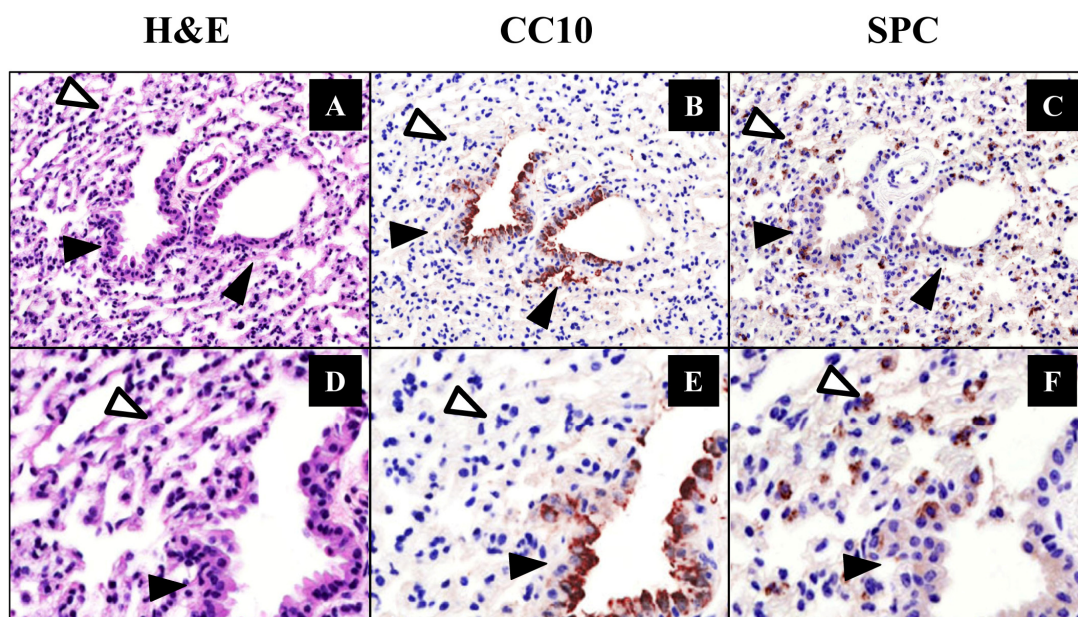


Figura 22: Patrón de expresión de SPC y CC10 en los pulmones del ratón $K\text{-Ras}^{+/V12}$; $RERT^{+/ert}$; $mkp1^{-/-}$ de la figura 21. Se estudió el patrón de expresión de los marcadores SPC y CC10 en las lesiones pulmonares desarrolladas en el ratón $K\text{-Ras}^{+/V12}$; $RERT^{+/ert}$; $mkp1^{-/-}$ de la figura 21 mediante técnicas de inmunohistoquímica. Las flechas blancas indican donde están situados los alveolos y las flechas negras donde se encuentran los bronquiolos. **A y D:** tinción para hematoxilina-eosina. **B y E:** tinción para CC10. **C y F:** tinción para SPC. Aumentos: **A, B y C** 20x. **D, E y F** área magnificada. H&E: hematoxilina-eosina.

Estos resultados indican que los adenomas y adenocarcinomas pulmonares desarrollados en los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan el oncogén K-Ras expresan los marcadores típicos de neumocitos tipo II (SPC+) de las lesiones inducidas por la expresión del oncogén K-Ras previamente descritas (108, 130, 149).

3.3. Estudio del mecanismo molecular responsable de la carcinogénesis de pulmón inducida por MKP1 y el oncogén K-Ras.

Se ha descrito que K-Ras desempeña un papel importante en la transformación tumoral mediante la activación de las vías Raf/MEK/ERK y/o PI3K/PDK/AKT (261). Concretamente en cáncer de pulmón, se ha demostrado que en los adenomas pulmonares la expresión de la forma oncogénica de K-Ras activa preferentemente la vía mitogénica Raf/MEK/ERK frente a la vía de supervivencia PI3K/PDK/AKT (108). Con el objetivo de elucidar el mecanismo molecular por el cual MKP1 favorece la formación de tumores pulmonares inducidos por K-Ras, estudiamos el estado de la vía de señalización ERK1/2, la cual está relacionada con progresión tumoral y cuya expresión está controlada por MKP1, en los pulmones de los ratones $K\text{-Ras}^{+/V12}$; $RERT^{+/ert}$; $mkp1^{+/+}$ y $K\text{-Ras}^{+/V12}$; $RERT^{+/ert}$; $mkp1^{-/-}$ tratados con 4-OHT. El análisis de la activación de la

quinasa ERK1/2 en las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones de la figura 16 mediante técnicas de inmunohistoquímica mostró una tinción de pERK1/2 parcheada y mayoritariamente centrada en la periferia de los adenomas y adenocarcinomas, cuyos mayores niveles de expresión se correlacionaron, en general, con lesiones de mayor grado. Todos los adenomas y adenocarcinomas presentes en los pulmones de los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} presentaron altos niveles de expresión de pERK1/2, mientras que las lesiones pulmonares desarrolladas por los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} presentaron menores niveles de expresión de la quinasa, existiendo incluso lesiones totalmente negativas para la tinción de p-ERK1/2 (Figura 23).

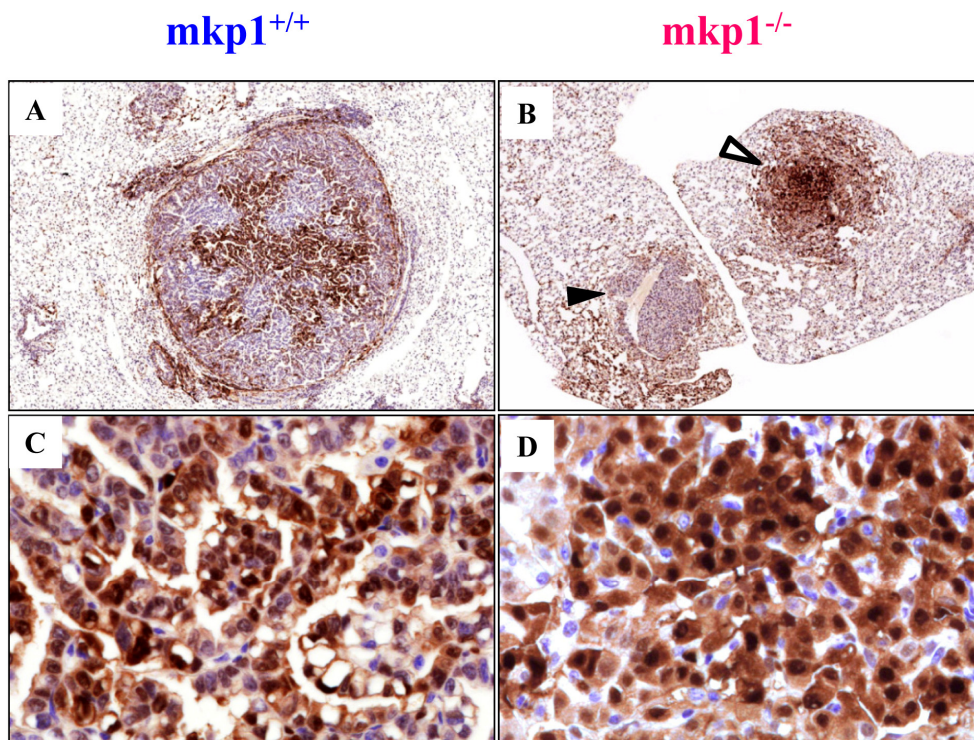


Figura 23: Expresión de pERK1/2 en las lesiones pulmonares desarrolladas en ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. Detección inmunohistoquímica de pERK1/2 en las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones de la figura 16. Todos los ratones portan el alelo mutante K-RasV12 en el gen K-Ras y el knock-in RERT^{+ert}. La flecha blanca indica la tinción positiva de pERK1/2 en un adenoma desarrollado en el pulmón de un ratón K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} (zona magnificada en la imagen D) y la flecha negra indica la tinción negativa de pERK1/2 en otro adenoma desarrollado en el pulmón del mismo ratón. Aumentos: A y B x4. C y D x40.

Estos resultados indican que la ausencia de MKP1 en ratones que expresan el oncogén K-Ras podría estar induciendo una menor activación de la vía ERK1/2 y por tanto, una reducción en la progresión de las lesiones pulmonares, lo que se refleja en un menor número, grado y tamaño de los adenomas y adenocarcinomas inducidos en los pulmones de estos animales.

Considerando que las diferencias observadas en el tamaño y número de las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones $Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{+/+}$ respecto a los que no expresan la fosfatasa pudieran deberse a un mayor grado de proliferación o un menor nivel de apoptosis inducidas por MKP1, estudiamos mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión del marcador de proliferación Ki67 y del marcador de apoptosis caspasa 3, en las lesiones inducidas por K-Ras en los pulmones de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de la figura 16. Todas las lesiones presentes en los pulmones de los ratones $Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{+/+}$ y $Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-}$ mostraron tinción positiva para el marcador Ki67 pero no se observó ninguna relación aparente entre el patrón de expresión de pERK1/2 y una mayor actividad proliferativa (Figura 24 panel superior), pareciendo estar más relacionados los niveles de proliferación con el grado de la lesión que con el genotipo de los ratones. Como se muestra en el panel inferior de la Figura 24, no se aprecia la existencia de apoptosis en las lesiones pulmonares inducidas por K-Ras en ninguno de los animales de ambos genotipos (la tinción nuclear para el marcador caspasa 3 activa que se observa no es indicativa de apoptosis). Lo que indica que las diferencias observadas en el tamaño y número de las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones $Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{+/+}$ y $Ras^{+/V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-}$ no se deben a un incremento en la muerte celular en los ratones que no expresan la fosfatasa.

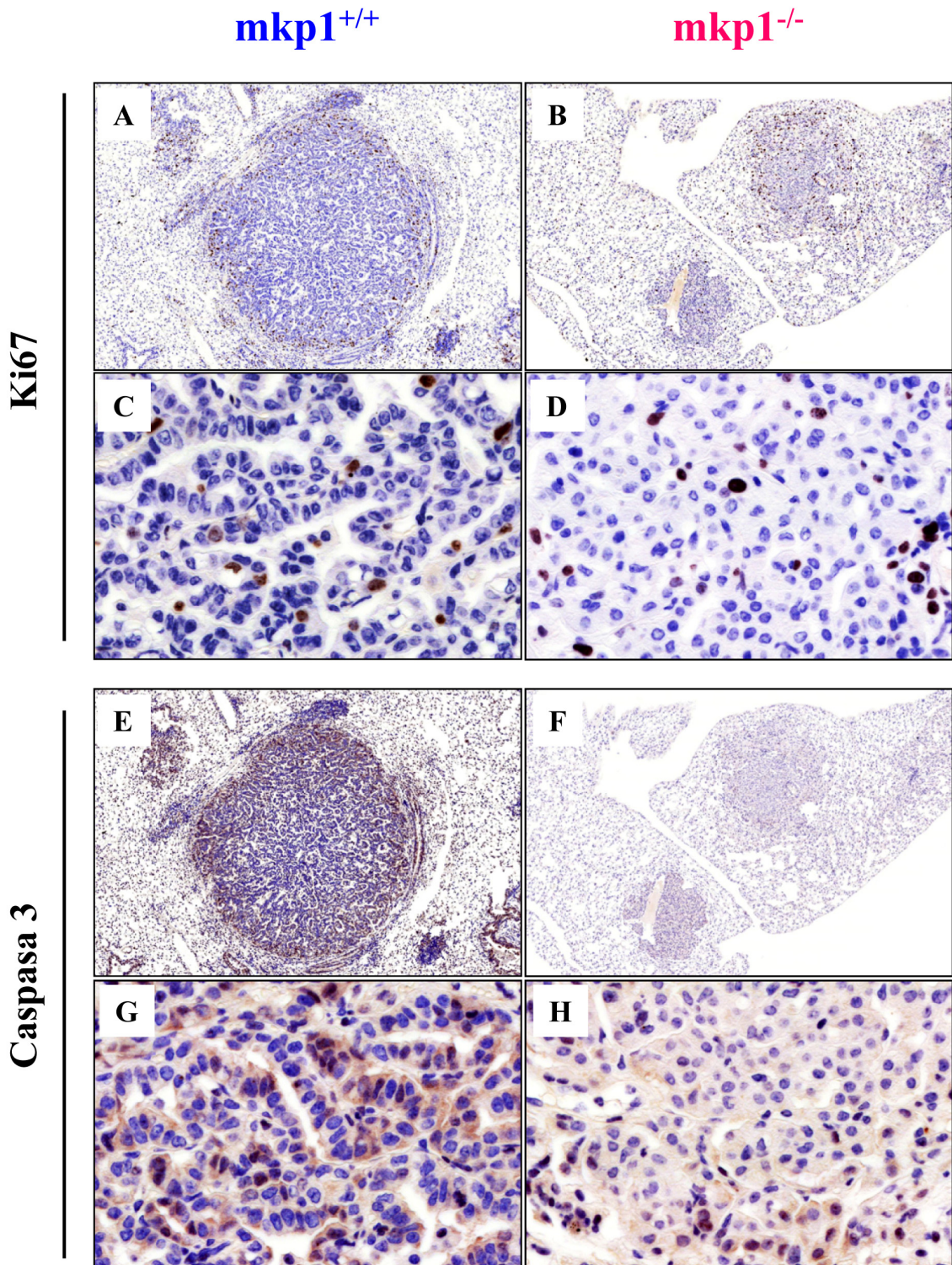


Figura 24: Expresión de Ki67 y caspasa 3 en las lesiones pulmonares desarrolladas en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ que expresan el oncogén K-Ras^{V12}. Detección inmunohistoquímica de Ki67 (panel superior) y caspasa 3 (panel inferior) en las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones de la figura 16. Todos los ratones portan el alelo mutante K-RasV12 en el gen K-Ras y el knock-in RERT^{+/-ert}. Aumentos: A, B, E y F x4. C, D, G y H x40.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PIEL EN RATONES DEFICIENTES EN MKP1 Y EN TUMORES HUMANOS.

El uso de modelos basados en sistemas animales ha proporcionado numerosos conocimientos en la bioquímica, biología, farmacología y genética del cáncer (122, 304). En estos modelos se puede inducir tumores con un rendimiento bastante elevado y permiten la manipulación de distintos parámetros que intervienen en la tumorogénesis (68). El 90% de los cánceres humanos derivan de células epiteliales, y se les denomina carcinomas (215), por ello el modelo de la carcinogénesis química de piel de ratón es de gran utilidad en el estudio del desarrollo tumoral, ya que reproduce de forma controlada la secuencia de eventos que conducen a la aparición de un cáncer de piel en el proceso de carcinogénesis humana (15, 73, 93, 304).

4.1. Estudio del papel de MKP1 en la aparición y desarrollo de tumores de piel en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Para determinar el efecto de la ausencia de MKP1 en la formación de tumores de piel, utilizamos el protocolo de inducción química de tumores de piel de ratón en dos etapas. Realizamos dos experimentos independientes de carcinogénesis química utilizando grupos de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de ambos sexos. En los dos experimentos, los dos grupos de ratones ($mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$), fueron iniciados con una dosis única de DMBA y promovidos con dos aplicaciones semanales de TPA durante 14 semanas, como se describe en materiales y métodos. Observamos una reducción significativa tanto en el número de ratones con lesiones (incidencia), como en el número total de lesiones en los ratones (multiplicidad) $mkp1^{+/+}$ con respecto a los ratones $mkp1^{-/-}$ durante todo el periodo de observación (Figuras 25A y 25B). Los papilomas aparecieron primero en los ratones $mkp1^{-/-}$ 4 semanas después de empezar la promoción con TPA, y en la semana 8 post-promoción el 100% de los ratones $mkp1^{-/-}$ habían desarrollado papilomas con una media de 6,6 papilomas por ratón (112 papilomas por línea). Por el contrario, no encontramos papilomas en los ratones $mkp1^{+/+}$ hasta 8 semanas después del tratamiento con TPA, donde solo el 5,6% de ratones $mkp1^{+/+}$ presentaron papilomas con una media de 0,1 papilomas por ratón (1 papiloma por línea). La diferencia en la incidencia y multiplicidad de papilomas entre los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ fue significativa desde la semana 6 hasta el final del periodo de promoción de tumores. Observamos la máxima incidencia de papilomas en los ratones $mkp1^{+/+}$ 16 semanas después del inicio de la promoción donde el 58,8% de los ratones presentaban papilomas con una media de 1,5 papilomas por ratón (26 papilomas por línea), mientras que en esa semana el 100% de los ratones $mkp1^{-/-}$ seguían teniendo papilomas con una media de 10,4 papilomas por ratón (177 papilomas por línea). No

se observaron diferencias significativas en la formación de papilomas entre machos y hembras en ninguno de los grupos (Figuras 25A, 25B, 27 y 28).

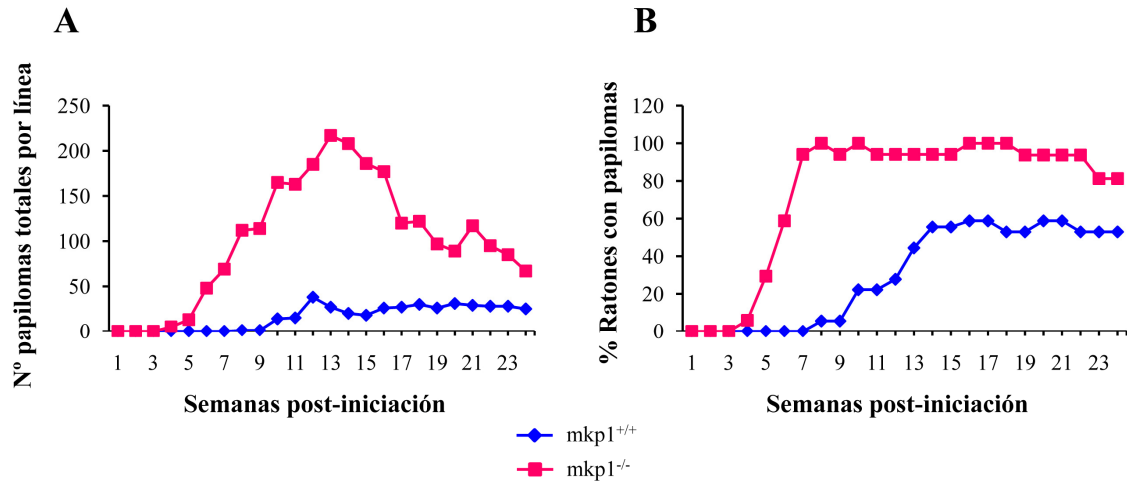


Figura 25: Cinética de aparición de lesiones cutáneas en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA. Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones $mkp1^{+/+}$ (n=17) y $mkp1^{-/-}$ (n= 16), se les trató con una única dosis tópica en piel de 32 μ g de DMBA diluido en 200 μ l de acetona y una semana después, se les aplicó dos dosis semanales de 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona cada una, durante 14 semanas. Todos los animales fueron examinados regularmente y se cuantificó el número de papilomas que presentaba cada ratón (incidencia) (A) y el número de ratones que habían desarrollado papilomas (multiplicidad) (B) semanalmente. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

Los primeros tumores se observaron macroscópicamente en los ratones $mkp1^{-/-}$ 8 semanas después del comienzo de la promoción con TPA mientras que en los ratones $mkp1^{+/+}$ no se observaron hasta la semana 15 post-promoción. Al término del experimento (semana 24 tras la promoción con TPA), el 87,5% de los ratones $mkp1^{-/-}$ presentaban tumores mientras que sólo el 5,9% de los ratones $mkp1^{+/+}$ habían desarrollado este tipo de lesiones cutáneas (Figuras 26, 27 y 28).

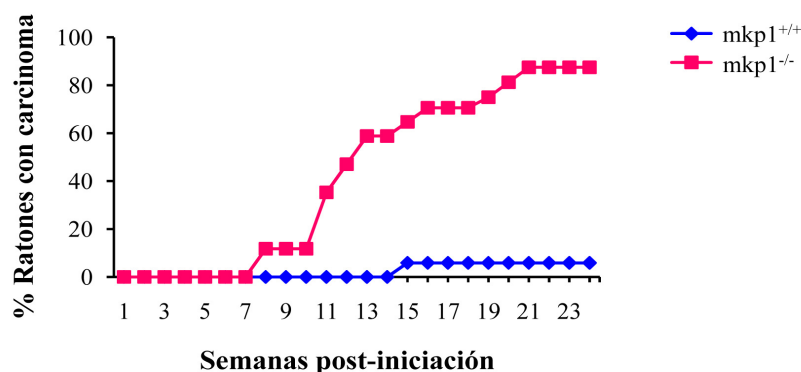


Figura 26: Cinética de aparición de tumores en la piel de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA. Se cuantificó semanalmente el número de ratones de la figura 25 que habían desarrollado tumores (multiplicidad). Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

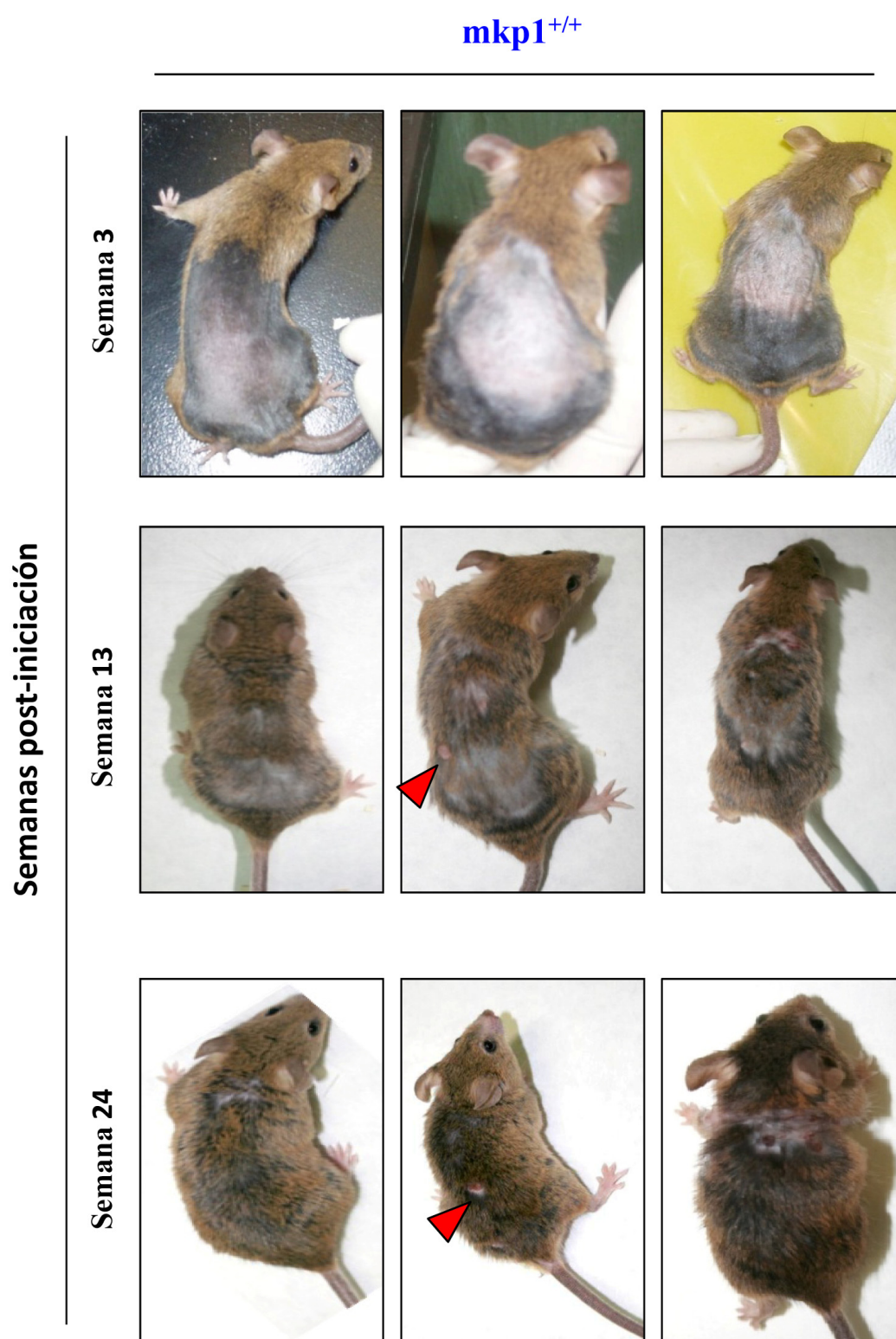


Figura 27: Imágenes representativas de la apariencia general de las lesiones desarrolladas en la piel de los ratones mkp1^{+/+} de la figura 25 a las 3, 13 o 24 semanas post-iniciación. Las flechas rojas indican la presencia de un papiloma en el lomo del animal.

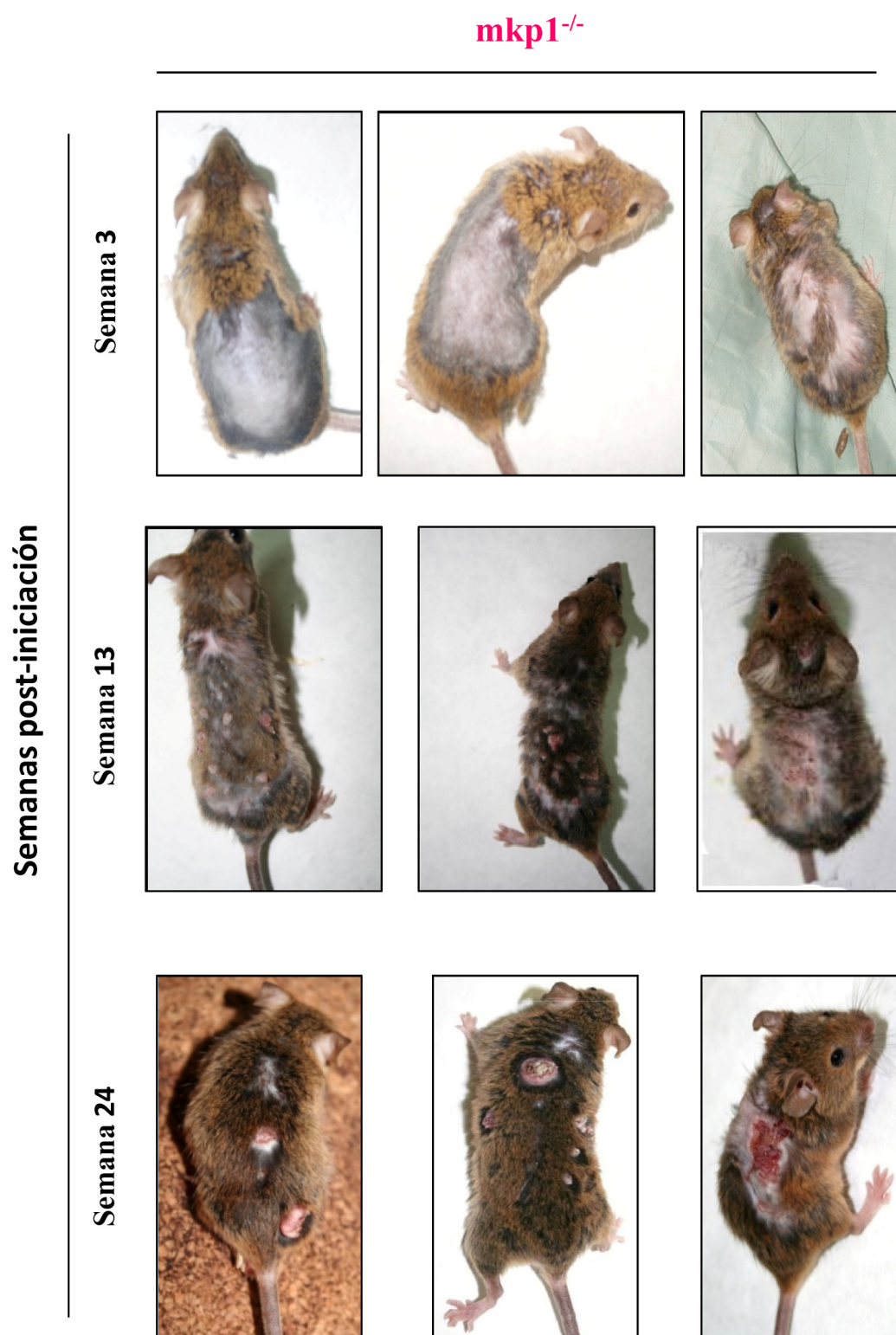


Figura 28: Imágenes representativas de la apariencia general de las lesiones desarrolladas en la piel de los ratones $mkp1^{-/-}$ de la figura 25 a las 3, 13 o 24 semanas post-iniciación.

El estudio histopatológico de los tumores en las pieles de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ al termino del experimento (semana 24 tras la promoción con TPA), reveló que los tumores de todos los ratones $mkp1^{-/-}$ eran carcinomas escamosos invasivos y que el 25% de estos ratones presentaban además carcinomas escamosos *in situ*. Sin embargo, el único tumor desarrollado en la piel de los ratones $mkp1^{+/+}$ (5,9%, un ratón de los 17) fue clasificado como carcinoma escamoso *in situ* (Tabla 2 y Figura 29).

	Nº de ratones con lesiones (%)			
	Papiloma escamoso	Papiloma escamoso con displasia	Carcinoma escamoso <i>in situ</i>	Carcinoma escamoso invasivo
$mkp1^{+/+}$	11 (64,7)	0	1 (5,9)	0
$mkp1^{-/-}$	2 (12,5)	14 (87,5)	4 (25)	14 (87,5)

Tabla 2: Clasificación histológica de los tumores desarrollados en la piel de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA. Los ratones de la figura 25 fueron sacrificados 24 semanas después de la primera aplicación con TPA, se extrajeron las pieles y se analizaron histológicamente las lesiones. En la tabla se indica los diferentes tipos de lesiones desarrolladas en la piel de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ así como el porcentaje de los mismos que las presentan. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

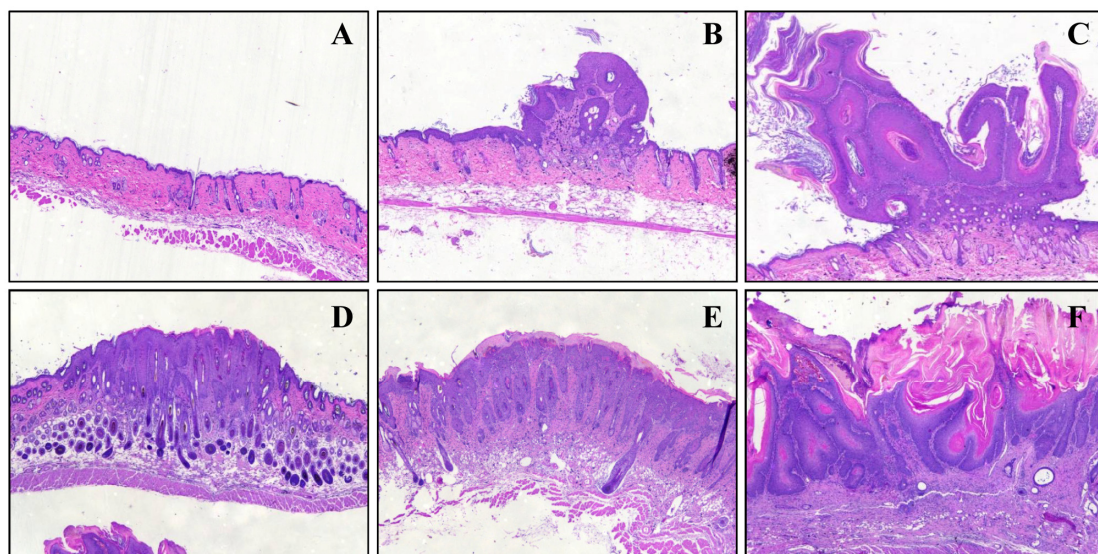


Figura 29: Histología de los tumores inducidos en los ratones $mkp1^{-/-}$ sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA. Los ratones de la figura 25 fueron sacrificados 24 semanas después de la primera aplicación con TPA, se extrajeron las pieles y se analizaron histológicamente las lesiones. **A)** Piel normal. **B)** Foco de hiperplasia epidérmica. **C)** Papiloma escamoso. **D)** Papiloma escamoso con displasia. **E)** Carcinoma escamoso *in situ*. **F)** Carcinoma escamoso invasivo. Los datos son representativos de las lesiones desarrolladas en las pieles de los ratones $mkp1^{-/-}$ de dos experimentos independientes. Escala x4.

Estos resultados sugieren que la ausencia de MKP1 favorece el desarrollo de tumores de piel en el modelo murino de carcinogénesis química epidermal y aumenta significativamente la progresión y conversión malignas.

4.2. Relación entre la expresión de MKP1 y la proliferación y/o diferenciación de las células epidermales.

Fenotípicamente los ratones $mkp1^{-/-}$ son prácticamente indistinguibles de los ratones $mkp1^{+/+}$. Quisimos investigar si esto también ocurría a nivel molecular. Para ello, estudiamos por un lado los niveles basales de expresión de quinasas de la familia MAPK y la expresión de diferentes marcadores de diferenciación epidermales en la piel de dichos ratones; y por otro, el efecto de la expresión de MKP1 sobre la hiperplasia en la piel de estos animales.

4.2.1. Análisis de la expresión de quinasas y marcadores de diferenciación epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

4.2.1.1. Análisis de la expresión de quinasas de la familia MAPK en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Estudiamos los niveles basales proteicos de diferentes quinasas de la familia MAPK cuya expresión está controlada por MKP1. Para ello, realizamos un análisis por inmunoblot de la expresión de ERK1/2, p38 y JNK1/2 en extractos epidermales de piel de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ no tratados. Como se muestra en la figura 30, no observamos cambios significativos en los niveles de expresión de las proteínas p38 y JNK1/2 en la epidermis de los ratones de ambos genotipos. Sin embargo, sí observamos un aumento en los niveles de expresión de ERK1/2 en la epidermis de los ratones $mkp1^{-/-}$ respecto a la de los ratones $mkp1^{+/+}$.

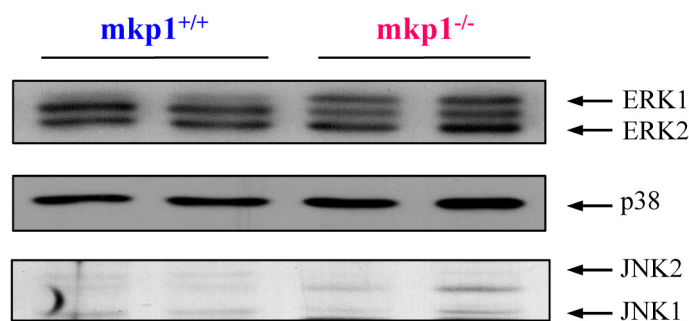


Figura 30: Niveles de expresión de MAPKs en la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ no tratados. Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones $mkp1^{+/+}$ (n=3) y $mkp1^{-/-}$ (n= 3) no tratados, se sacrificaron y se obtuvieron los extractos proteicos epidermales. Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas ERK1/2, p38 y JNK1/2 mediante western blot.

Estos resultados sugieren que en condiciones basales, la ausencia de MKP1 podría estar favoreciendo la expresión de la quinasa ERK1/2.

4.2.1.2. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación de queratinocitos en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Algunas de las proteínas sintetizadas por los queratinocitos durante el proceso de queratinización son utilizadas como marcadores de diferenciación. Estas son, entre otras, la queratina 5, queratina 10 (K10), loricrina, involucrina o filagrina. Con el fin de estudiar si los ratones $mkp1^{-/-}$ mantienen la arquitectura del tejido epidermal presente en los ratones $mkp1^{+/+}$, analizamos la expresión de tres de estos marcadores de diferenciación en la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ P4 (día 4 postnatal) no tratados y en ratones adultos sometidos al protocolo de carcinogénesis química, mediante técnicas de inmunohistoquímica. Observamos niveles similares de expresión de K10 en la epidermis de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ neonatos; mientras que la expresión de loricrina e involucrina fue mucho menor en las pieles de los ratones neonatos que no expresan la fosfatasa respecto a los que presentan el genotipo salvaje (Tabla 3 y Figura 31). Por el contrario, en la piel de ratones adultos que habían sido sometidos al protocolo de inducción química de tumores en dos etapas, la K10 presentó unos niveles de expresión muy altos en piel normal, menores en papilomas y más bajos aún en carcinomas. Observamos también que la expresión de loricrina e involucrina fue muy baja en la epidermis sana de estos ratones, prácticamente ausente en papilomas e inexistente en carcinomas. No se apreciaron diferencias significativas en la expresión de los tres marcadores de diferenciación entre la epidermis de los ratones $mkp1^{+/+}$ sometidos a carcinogénesis química y los que no expresan la fosfatasa (Datos no mostrados).

Tabla 3	K10	Loricrina	Involucrina
	DAB (p=0.008)	DAB (p=0.002)	DAB (p=0.001)
mkp1^{+/+}	180,72 ± 5,42	72,77 ± 2,18	84,11 ± 2,52
mkp1^{-/-}	153,21 ± 4,60	36,11 ± 1,08	36,32 ± 1,09

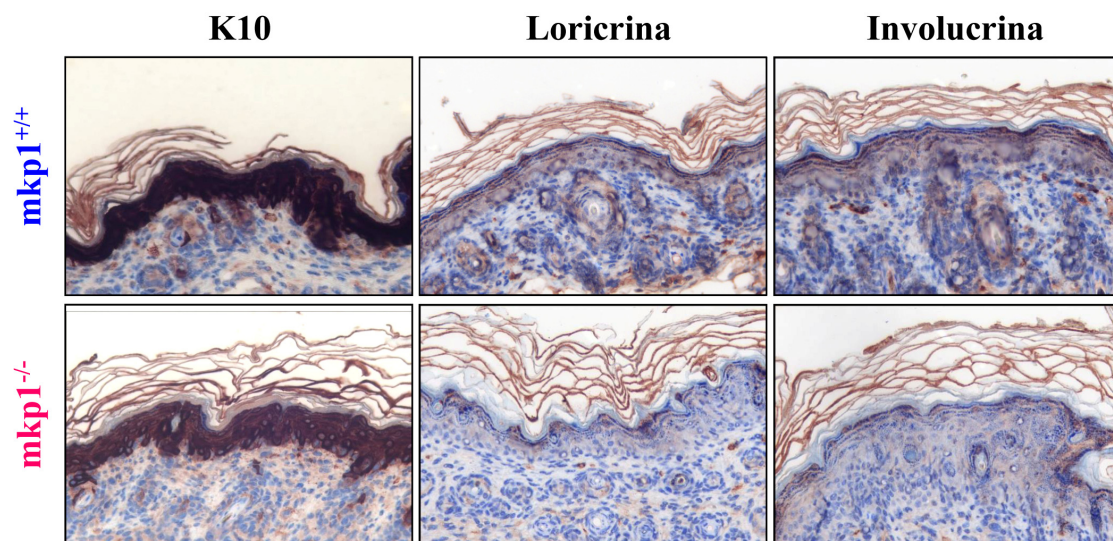


Figura 31: Expresión de marcadores de diferenciación de queratinocitos en la epidermis de ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-}. Tabla 3) Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones mkp1^{+/+} (n=7) y mkp1^{-/-} (n= 7) P4 (día 4 postnatal) no tratados. Se sacrificaron, se extrajeron las pieles y se analizó la expresión de K10, loricrina e involucrina mediante técnicas de inmunohistoquímica. La tabla indica los niveles densitometrados de DAB ± S.D obtenidos mediante análisis de imagen multiespectral. **Figura 31)** Imágenes representativas de la detección inmunohistoquímica de K10, loricrina e involucrina en la epidermis de ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} P4 no tratados.

Las proteínas loricrina e involucrina son expresadas por las células epidermales durante la última etapa del proceso de queratinización. Los resultados obtenidos en este apartado muestran que nada más nacer, la piel de los ratones que no expresan la fosfatasa MKP1 presenta un fallo en el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos epidermales, el cual es reparado posteriormente de modo que cuando el animal es adulto no existen alteraciones en el proceso de queratinización en la epidermis de dichos ratones.

4.2.2. Estudio del efecto del tratamiento con DMBA o TPA sobre la proliferación celular e hiperplasia epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$.

Con el fin de esclarecer el mecanismo por el cual los ratones $mkp1^{+/+}$ presentan resistencia a la carcinogénesis de piel multiseccional, evaluamos si los niveles de MKP1 alteraban la respuesta proliferativa de las células epidermales al tratamiento con DMBA o TPA. Para ello, dos grupos de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de ambos sexos fueron sometidos a un tratamiento agudo con DMBA o TPA. Los ratones fueron tratados tópicamente con una dosis de DMBA o TPA y sacrificados al día siguiente o tratados con dosis repetidas de DMBA o TPA cada 24 horas y sacrificados al segundo, tercer o cuarto día como se describe en materiales y métodos. Todos los ratones tratados con TPA fueron inyectados con BrdUrd 1 hora antes de ser sacrificados. Observamos un mayor engrosamiento de la piel en los ratones tratados con DMBA o TPA respecto a los ratones control. Esta hiperplasia fue mayor en la epidermis de los ratones $mkp1^{-/-}$ tratados durante 4 días con ambos agentes químicos en comparación con los ratones $mkp1^{+/+}$ (Tabla 4 y Figuras 32 y 33A). El tratamiento con DMBA, pero no con TPA, también indujo displasia, apreciándose los mayores cambios en la epidermis de los ratones $mkp1^{-/-}$ tras cuatro días de tratamiento (Figura 33B). Además, una única aplicación tópica de TPA produjo un aumento en la proliferación epidermal de los ratones que no expresan MKP1, ya que el porcentaje de células positivas para la incorporación de BrdUrd fue significativamente mayor desde el primer día en los ratones $mkp1^{-/-}$ tratados con TPA en comparación a los ratones $mkp1^{+/+}$ (Figura 34).

	Grosor Epidermis (μ m)					
	DMBA			TPA		
	Control	Día 1	Día 4 ($p=0,001$)	Control	Día 1	Día 4 ($p=0,002$)
$mkp1^{+/+}$	16,86 \pm 1,77	46,69 \pm 28,20	62,24 \pm 22,06	16,86 \pm 1,77	44,07 \pm 7,66	47,40 \pm 7,07
$mkp1^{-/-}$	18,71 \pm 1,80	55,59 \pm 32,10	73,19 \pm 22,35	18,71 \pm 1,80	44,33 \pm 7,48	57,6 \pm 10,66

Tabla 4: Hiperplasia epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$. Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones $mkp1^{+/+}$ ($n=34$) y $mkp1^{-/-}$ ($n=34$) y se trataron tópicamente con una dosis de 32 μ g de DMBA diluido en 200 μ l de acetona o 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona. Los ratones control se trataron sólo con 200 μ l de acetona en cada aplicación. Los ratones fueron sacrificados al día siguiente o tratados con dosis repetidas de DMBA o TPA cada 24 horas y sacrificados al segundo, tercer o cuarto día como se describe en materiales y métodos. Se extrajeron las pieles de los ratones, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluó la morfometría de la epidermis. La tabla indica el grosor de la epidermis de los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ en los días 1 y 4 de tratamiento con DMBA o TPA. Se presenta la media \pm S.D de 4 ratones en cada condición experimental.

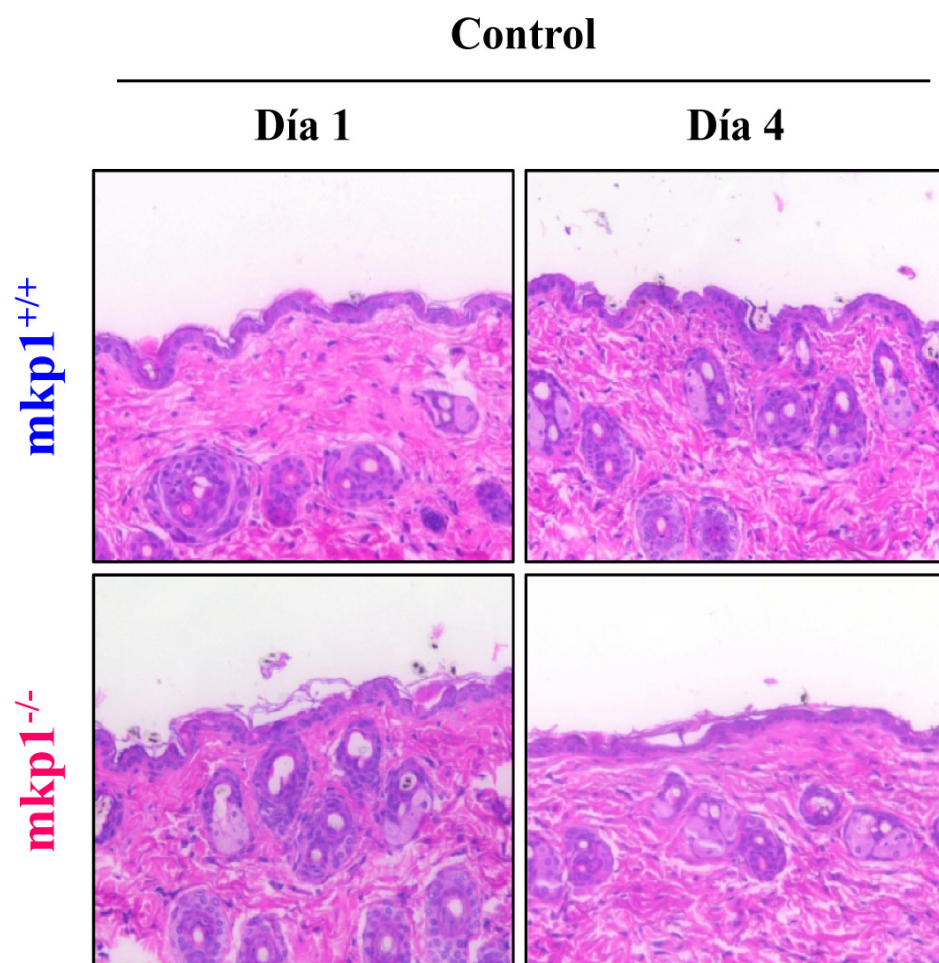


Figura 32: Hiperplasia epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$. Imágenes representativas de epidermis morfológicamente normal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de la tabla 4 tratados sólo con 200 μ l de acetona. Escala x20.

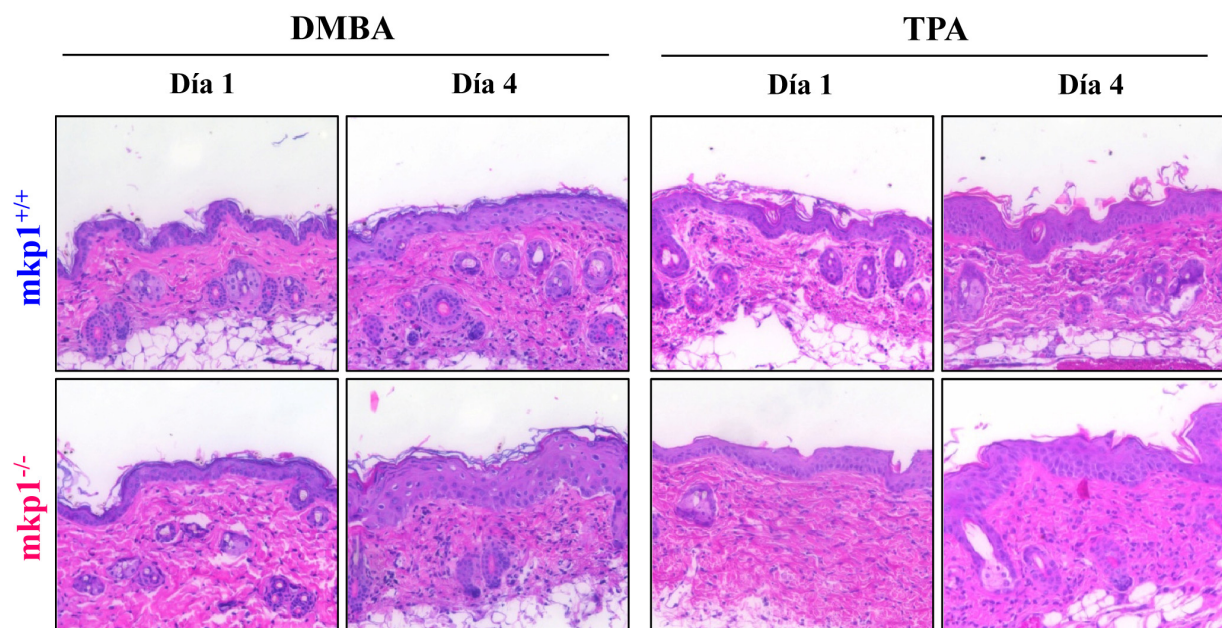
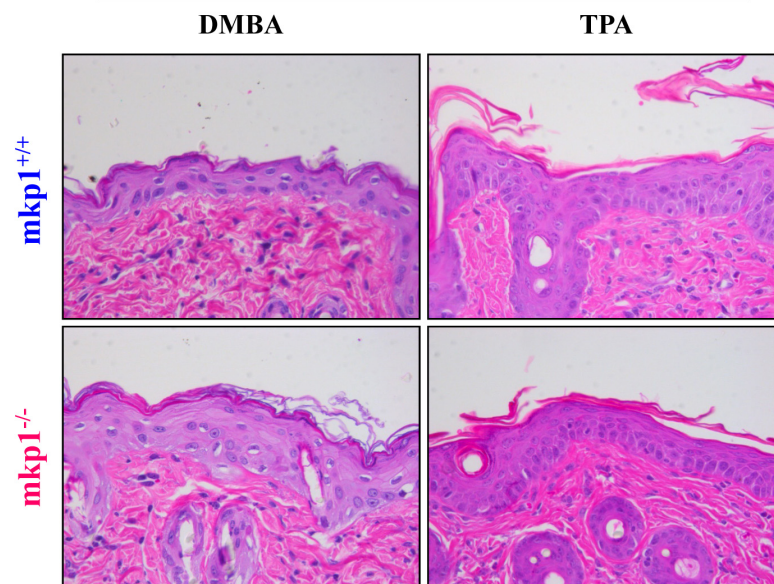
A**Hiperplasia****B****Displasia (Día 4)**

Figura 33: Hiperplasia y displasia epidermal en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$. Imágenes representativas de epidermis con cambios de hiperplasia **A)** y displasia **B)** en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de la tabla 4 en los días 1 y 4 de tratamiento con 32 μ g de DMBA diluido en 200 μ l de acetona o 12,5 μ g de TPA diluido en 200 μ l de acetona. Escala x20.

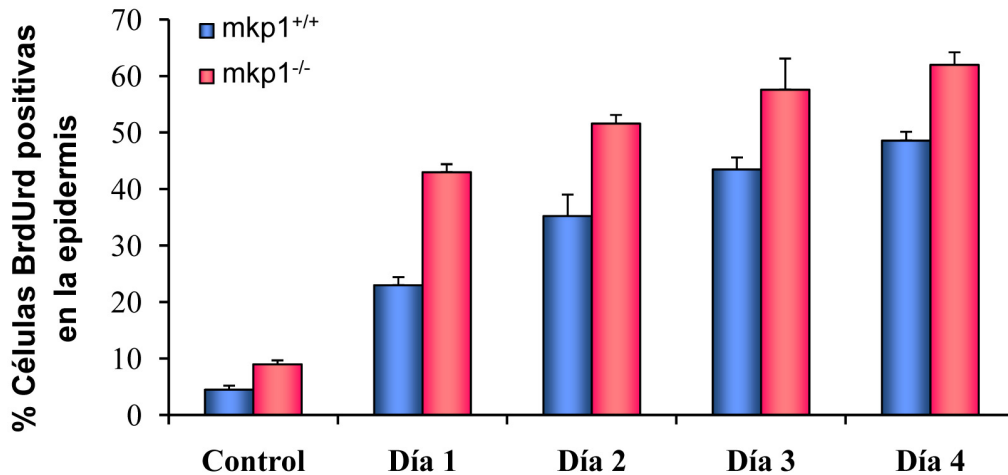


Figura 34: Cambios en la proliferación celular de la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$. Todos los ratones de la tabla 4 tratados con TPA fueron inyectados con BrdUrd 1 hora antes de ser sacrificados. Se obtuvieron secciones del tejido epidermal de los diferentes ratones y se tiñeron con anti-BrdUrd. Se cuantificó el número de células positivas para BrdUrd presentes en un mínimo de 250 células epidermales en cada muestra. La gráfica muestra el porcentaje \pm S.D de células epidermales positivas para BrdUrd en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ tratados con TPA durante los periodos de tiempo indicados.

Estos resultados indican que la sensibilidad al desarrollo de tumores mostrada por la piel de ratones $mkp1^{-/-}$ es debida, al menos en parte, a un aumento en la proliferación epidermal durante la promoción de tumores.

4.3. Estudio del mecanismo molecular responsable de la carcinogénesis inducida por DMBA-TPA en ratones $mkp1^{-/-}$.

Se ha demostrado que el tratamiento con DMBA de la piel de ratones induce la activación de Ras en el modelo de carcinogénesis química de piel (23, 129, 208). En una vía típica, la activación de Ras inicia una cascada de proteínas quinasas que lleva a la activación de JNK1/2, p38 y ERK1/2, entre otras MAPKs, cuya expresión está regulada por la fosfatasa MKP1 (11, 29, 148). Con el objetivo de elucidar el mecanismo molecular por el cual la piel de ratones que expresan MKP1 presenta un menor índice de proliferación celular en respuesta al tratamiento con TPA, estudiamos el efecto de la deficiencia de MKP1 sobre la activación de las diferentes MAPKs. Para ello, dos grupos de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ de ambos sexos fueron tratados tópicamente con una dosis de acetona (control), DMBA o TPA y sacrificados 3 horas después. Se obtuvieron los extractos proteicos epidermales y se estudió la activación de estas quinasas mediante western blot, utilizando anticuerpos capaces de detectar los niveles de las proteínas fosforiladas. Como se muestra en la figura 35, no se observaron diferencias en la activación inducida por DMBA o TPA de JNK1/2 y p38 entre ambos genotipos. Sin embargo, la inducción

de la fosforilación de ERK1/2 por TPA fue mayor en la piel de ratones carentes de la expresión de MKP1.

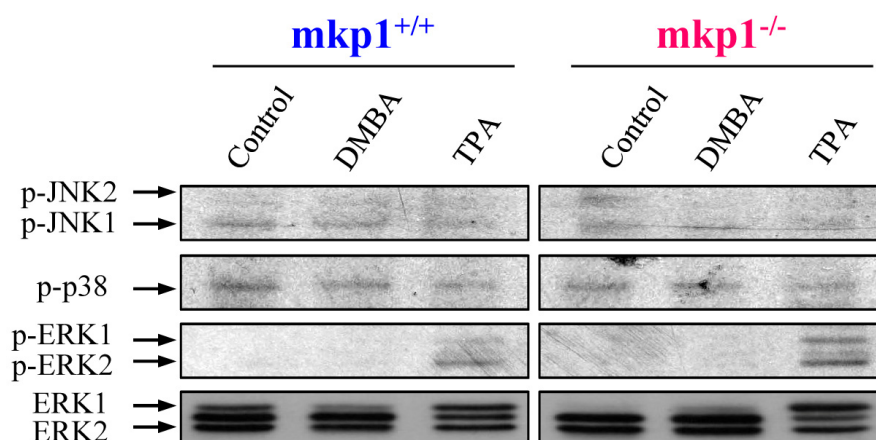


Figura 35: Activación de MAPKs en la epidermis de ratones *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-} tratados con DMBA o TPA. Se seleccionaron dos grupos experimentales de ratones *mkp1*^{+/+} (n=12) y *mkp1*^{-/-} (n=12), se trataron tópicamente con una dosis de acetona (control), DMBA o TPA y se sacrificaron 3 horas después. Se obtuvieron los extractos proteicos epidermales y se estudiaron mediante western blot los cambios en la fosforilación de JNK1/2, p38 y ERK1/2. La forma no fosforilada de ERK1/2 se muestra como control de carga. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la ausencia de MKP1 induce la activación de la vía ERK1/2, implicada en promover la proliferación y progresión del ciclo celular, en la piel de ratones tratados químicamente.

Se ha descrito que el factor de transcripción Stat3 juega un papel importante en carcinogénesis (4, 150) y estudios recientes han mostrado un papel esencial de este factor de transcripción en tumorigénesis de piel de ratón (58-59, 216). Debido a esto, decidimos estudiar la activación de Stat3 en la piel de ratones que expresan o no la fosfatasa MKP1, tratados con DMBA o TPA durante un corto periodo de tiempo (3 horas) o tras un tratamiento agudo con ambos compuestos. La figura 36A muestra que no existen diferencias en la fosforilación de este factor de transcripción, inducida por DMBA o TPA tras 3 horas de tratamiento, entre ratones *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-}. Del mismo modo, en las figuras 36B y 36C observamos que el tratamiento repetido con DMBA o TPA durante 4 días induce una mayor expresión de Stat3 respecto al control, pero tampoco existen diferencias significativas en la expresión de dicho factor de transcripción inducida por DMBA o TPA entre ratones *mkp1*^{+/+} y *mkp1*^{-/-}. Estos resultados indican que Stat3 no interviene en la inducción de tumores cutáneos en ratones que no expresan MKP1.

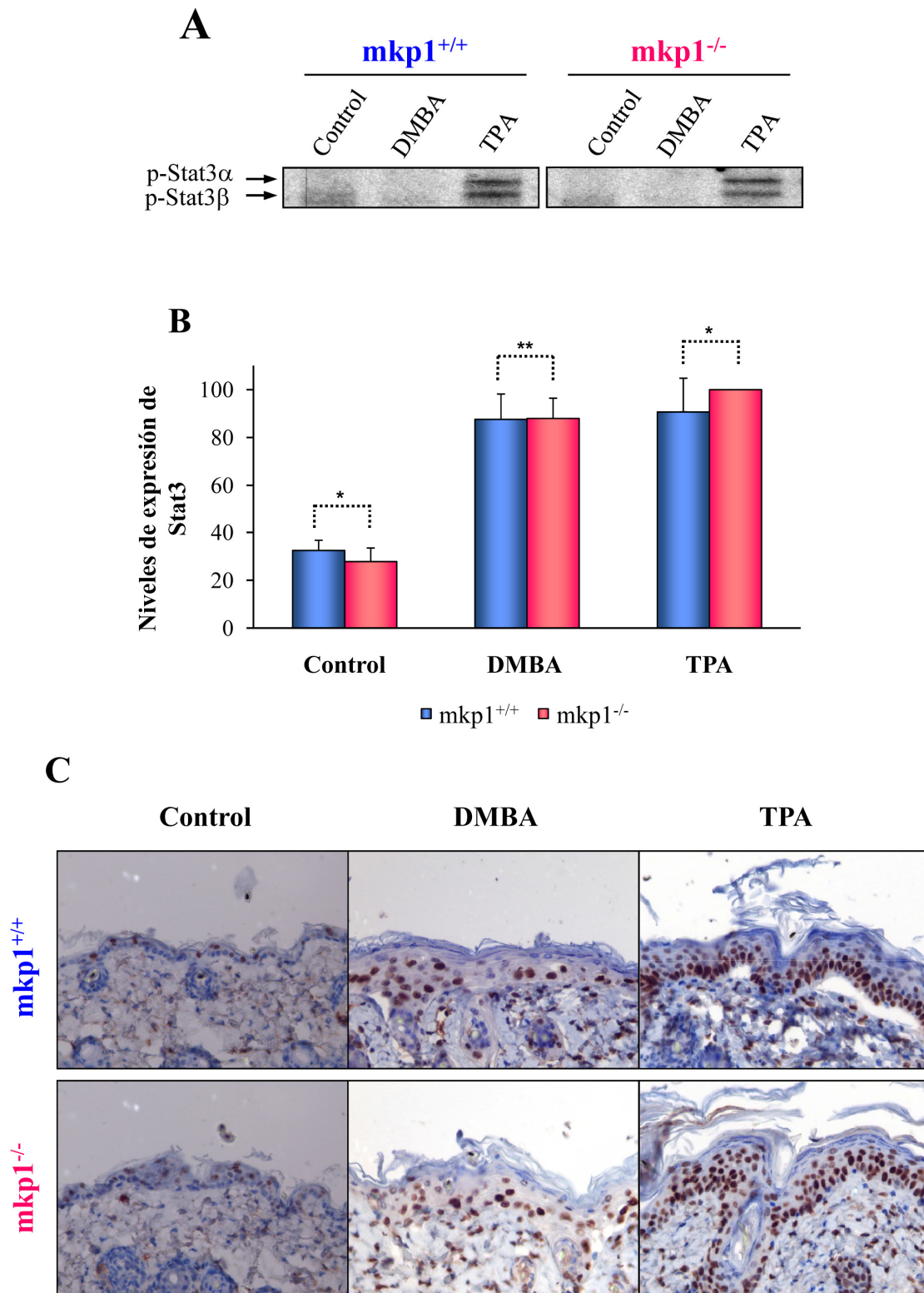


Figura 36: Activación y expresión de Stat3 en la epidermis de ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} tratados con DMBA o TPA. **A)** Se estudió el cambio en la fosforilación de Stat3 mediante western blot en los extractos proteicos epidermales de los ratones de la figura 35. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. **B)** Se estudiaron mediante inmunohistoquímica los niveles de expresión de Stat3 en la epidermis de ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} sometidos a un tratamiento agudo con DMBA o TPA (ratones de la tabla 4). Las graficas muestran las medias de señales positivas para la tinción con anti-Stat3 por campo \pm S.D de 4 ratones para cada condición experimental. *: $p=0.180$; **: $p=0.999$. **C)** Imágenes representativas de la detección inmunohistoquímica de Stat3 en la epidermis de ratones mkp1^{+/+} y mkp1^{-/-} sometidos a un tratamiento agudo con DMBA o TPA (ratones de la tabla 4). Escala x40.

Otro factor de transcripción implicado en carcinogénesis de piel es p53 (44). Cuando estudiamos los niveles de expresión de p53 en la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos a un tratamiento agudo con DMBA o TPA mediante técnicas de inmunohistoquímica, observamos que el tratamiento con ambos compuestos indujo la expresión del factor de transcripción, siendo ésta mayor en respuesta al tratamiento con DMBA, pero no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de p53 entre ratones de ambos genotipos (Figura 37A). Del mismo modo, tampoco observamos diferencias significativas en la expresión de p53 ni en la epidermis normal ni en los papilomas desarrollados por los ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos al protocolo de inducción química de tumores en dos etapas (Figura 37B). Sin embargo, se produjo un aumento significativo en la expresión de p53 en los papilomas desarrollados por los ratones $mkp1^{-/-}$ respecto a la piel normal, siendo este aumento mucho mayor aún en los carcinomas desarrollados por dichos ratones (Figura 37B).

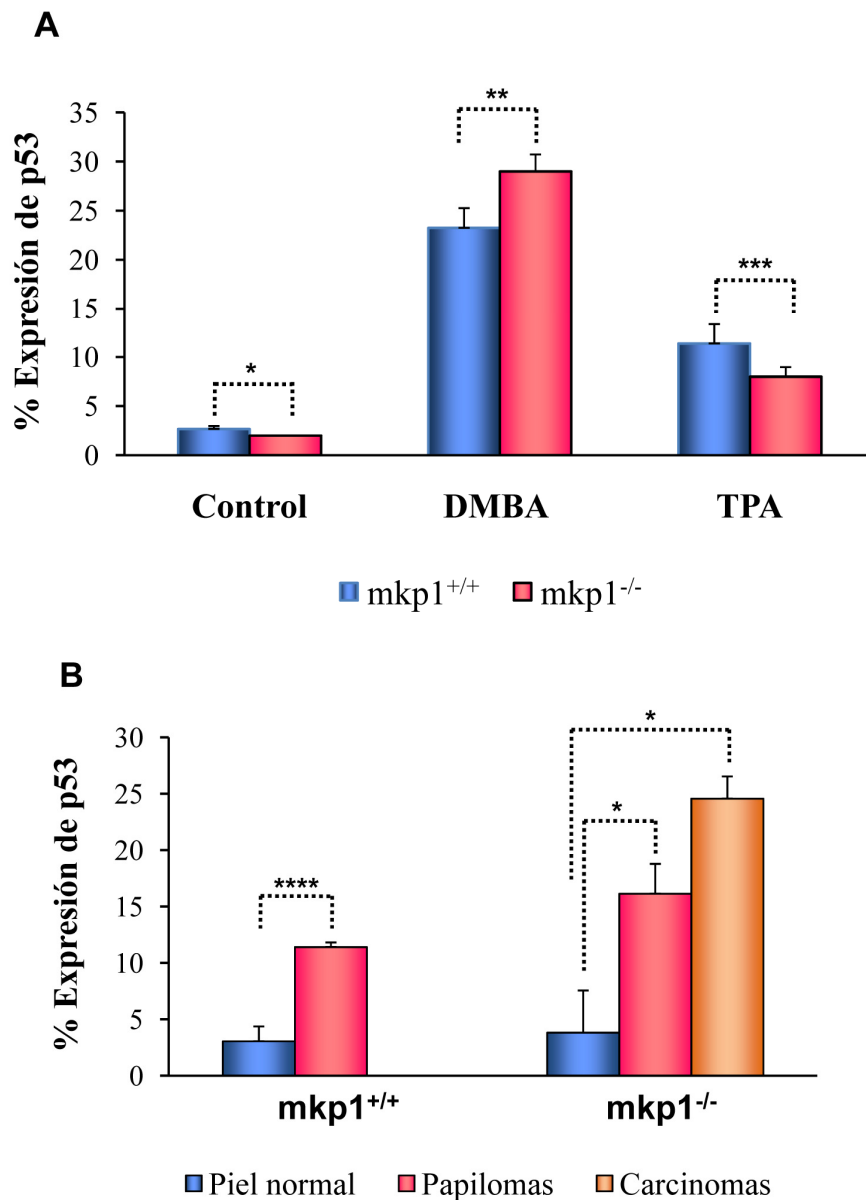


Figura 37: Expresión de p53 en la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ tratados con DMBA, TPA o DMBA/TPA. Se estudiaron mediante inmunohistoquímica los niveles de expresión de p53 en la epidermis de ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ tratados con dosis repetidas de DMBA o TPA **A)** durante 4 días (ratones de la tabla 4) y en ratones $mkp1^{+/+}$ y $mkp1^{-/-}$ sometidos al protocolo de carcinogénesis química con DMBA/TPA **B)** (ratones de la figura 25). Las graficas muestran las medias \pm S.D de 4 ratones para cada condición experimental. *: $p < 0.001$; **: $p = 0.207$; ***: $p = 0.080$; ****: $p = 0.003$.

Estos datos sugieren que el tratamiento individualizado con DMBA o TPA no es suficiente para afectar la expresión/estabilización de p53 en ausencia de MKP1, mientras que el tratamiento combinado de estos ratones con dichos agentes sí produce alteraciones en la expresión del factor de transcripción. Por tanto, p53 podría estar relacionada con la carcinogénesis de piel inducida por DMBA/TPA en ratones que no expresan MKP1.

4.4. Estudio de los niveles de expresión de MKP1 en biopsias de pacientes con cáncer de piel.

Como se ha comentado en la introducción, diversos estudios han demostrado que la expresión de MKP1 se encuentra incrementada en cáncer de colon, próstata, vejiga, ovario, mama y CNMP. Sin embargo, el papel de esta fosfatasa en carcinogénesis parece ser específico del tipo de tejido, ya que también se ha encontrado una expresión disminuida de MKP1 en otros tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular o testicular. Por lo tanto, se hace preciso estudiar el papel de MKP1 en cada tipo tumoral.

Con el objetivo de investigar la relevancia de MKP1 en el desarrollo del cáncer de piel, se analizaron los niveles de expresión de MKP1 en diferentes biopsias de tumores cutáneos humanos y se compararon con la expresión de esta fosfatasa en piel normal. Para ello, se estudiaron los niveles de expresión génica de *mkp1* en biopsias de piel de 31 pacientes con diferentes enfermedades cutáneas obtenidas del Departamento de Patología del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid). Las distintas enfermedades cutáneas humanas incluidas en este estudio fueron carcinoma basocelular (n=12), carcinoma escamoso (n=9) y piel normal (n=10). Se extrajo el ARN de los tejidos tumorales y normales y se analizaron los niveles de expresión de MKP1 por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).

La expresión de MKP1 en todos los tejidos tumorales se comparó con la mostrada en todos los tejidos normales, encontrándose que los niveles de expresión génica de la fosfatasa estaban significativamente disminuidos en todas las muestras tumorales analizadas (Figura 38).

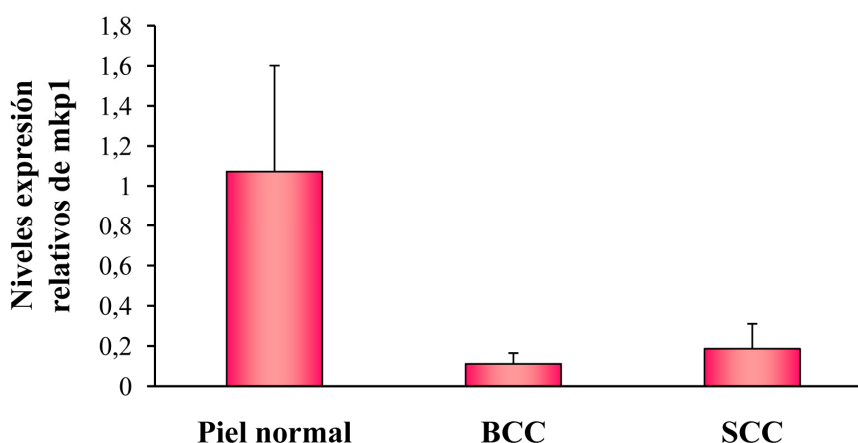


Figura 38: Niveles de expresión génica de *mkp1* en muestras de piel humanas determinados por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR). Piel normal (n=10); BCC, Carcinoma Célula Basal (n=12); SCC, Carcinoma Célula Escamosa (n=9).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el modelo murino de carcinogénesis química de piel, corroborando el desarrollo de tumores cutáneos en ausencia de MKP1.

Discusión

DISCUSIÓN

MKP1, uno de los miembros de la familia de fosfatasa dual mejor estudiado, está implicado en quimioresistencia a diversos agentes terapéuticos y en la iniciación y progresión tumoral de varios tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón, mama, próstata, ovario, páncreas, hígado y adenocarcinoma gástrico (298). En este trabajo hemos investigado el papel de MKP1 en respuesta al tratamiento con diferentes agentes quimioterápicos utilizados en clínica, y su papel en la carcinogénesis y progresión de dos tipos diferentes de tumores *in vivo*, el cáncer de pulmón y el cáncer de piel. También hemos estudiado el mecanismo molecular por el que el CBDCA induce resistencia en líneas celulares de CNMP. Nuestros resultados muestran que MKP1 desempeña un papel fundamental en la resistencia a agentes alquilantes y en la carcinogénesis y desarrollo del cáncer de pulmón y piel, por lo que esta fosfatasa podría ser una importante diana terapéutica en pacientes con este tipo de tumores.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN RESPUESTA A DIFERENTES AGENTES ANTITUMORALES.

La resistencia a los fármacos es uno de los principales obstáculos en los tratamientos del cáncer y disminuye la eficacia de la quimioterapia. Recientemente se ha identificado a MKP1 como un mediador importante de resistencia a varios agentes quimioterápicos en distintos tipos de tumores. Se ha descrito que la sobreexpresión de MKP1 en líneas celulares de cáncer de mama induce resistencia al tratamiento con mecloretamina, doxorubicina y taxol (259), mientras que la inhibición de la expresión de esta fosfatasa en células de cáncer de pulmón sensibiliza éstas al tratamiento con CDDP (60, 293). También se ha demostrado que la expresión de MKP1 en líneas celulares de glioma y leucemia linfoblástica aguda induce resistencia a etopósido (177) y vincristina (189) respectivamente. Ensayos *in vivo* han puesto de manifiesto que en un modelo de fibrosis pulmonar idiopática inducida por bleomicina, la eficiencia de inducción de fibrosis es menor en ratones nulos para MKP1 respecto a los ratones control (253), y que la inhibición de la actividad de MKP1 con el inhibidor TPI-3 sensibiliza al tratamiento con 5-Fluorouracilo en un modelo de xenotransplantes de la línea celular de cáncer de colon MC-26 (161).

En este trabajo hemos observado que en un sistema no tumoral en el que se encuentra alterada la de expresión de MKP1, el tratamiento con los agentes alquilantes CDDP, CBDCA y OXALI-Pt de las células que no expresan la fosfatasa induce una mayor sensibilidad a éstos mediante la activación de las quinasas JNK1/2 y p38. Sin embargo, tras el tratamiento con el resto de agentes quimioterápicos no hemos observado ninguna relación entre la apoptosis inducida por estos fármacos y las MAPKs activadas por los mismos, lo que indica que en

células normales, la expresión de MKP1 favorece de forma específica la resistencia al tratamiento con los agentes alquilantes mediante la regulación de las vías de las MAPKs relacionadas con muerte celular.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL CARBOPLATINO EN CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN.

El cáncer de pulmón, concretamente el CNMP, es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Esto se debe fundamentalmente al diagnóstico tardío de la enfermedad y al desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Los agentes antitumorales derivados de platino, CDDP y CBDCA, se han utilizado en la clínica durante los últimos 20 años en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, jugando un papel primordial en la terapia del CNMP. Desafortunadamente, muchos pacientes con esta enfermedad recaen y se hacen refractarios a la quimioterapia. Así, la adquisición o presencia de resistencia a CDDP y CBDCA limita la eficacia de estos agentes terapéuticos. Por ello, el conocimiento de las rutas de señalización activadas por ambos compuestos y que participan en la inducción de la muerte celular, se hace indispensable en la mejora de la terapia.

En este trabajo hemos investigado la sensibilidad a CBDCA, en comparación con CDDP, de tres líneas celulares derivadas de CNMP, las células H23, H460 y H1299. La línea celular H1299 presenta mayor resistencia al tratamiento con ambos agentes quimioterápicos que las otras dos líneas celulares. El análisis del perfil del ciclo celular muestra que la mayor sensibilidad presentada por las líneas celulares H23 y H460 al tratamiento con CBDCA es debida a un aumento en la apoptosis inducida por éste, mientras que en las células resistentes H1299 se produce una acumulación de la población celular en el punto de control G2/M que podría favorecer la resistencia al tratamiento, por ejemplo, por un incremento en la reparación de las lesiones del ADN. La resistencia a CDDP generalmente es multifactorial (121) y puede deberse a la alteración de diferentes procesos celulares como el transporte del fármaco al citoplasma y/o núcleo, la reparación del ADN o fallos en las rutas de señalización de apoptosis entre las que se encuentran las vías de las MAPKs (178, 220, 230). Trabajos previos han demostrado que la activación de JNK1/2 está implicada en la apoptosis inducida por CDDP en CNMP (60) y cáncer de ovario (167), mientras que la activación de p38 por este fármaco se relaciona con la resistencia a CDDP en diferentes líneas tumorales (38, 179). También se ha descrito que la inhibición de la actividad de ERK1/2 aumenta la sensibilidad a CDDP en líneas celulares de cáncer de ovario (295).

No existe información en la literatura que permita establecer alguna relación entre la activación de las vías de señalización de las MAPKs y resistencia a CBDCA en CNMP. Tampoco se ha descrito nada acerca del mecanismo molecular por el que se induce resistencia al

CBDCA en CNMP. Ensayos clínicos muestran una mayor respuesta terapéutica en el tratamiento del CNMP en estadios III y IV con una en terapia combinada que incluye CBDCA comparada con la que emplea CDDP (106, 199). Asimismo, el CBDCA no presenta nefrotoxicidad y es menos tóxico para el tracto gastrointestinal y menos neurotóxico que el CDDP (140). Teniendo en cuenta las ventajas que presenta el CBDCA respecto al CDDP, y con el fin de encontrar una estrategia para mejorar su actividad terapéutica, decidimos estudiar las rutas de señalización activadas por CBDCA en CNMP.

Nuestros resultados indican que al igual que lo descrito para CDDP en células H460 (60), en respuesta al tratamiento con CBDCA en las líneas sensibles H460 y H23 existe una buena correlación entre activación de JNK1/2 y p38, inhibición de la expresión de MKP1 e inducción de apoptosis, pero con una cinética de activación más tardía que la que tiene lugar en respuesta al tratamiento con CDDP. Por el contrario, la línea resistente H1299 presenta una activación persistente tanto de JNK1/2 como de p38 pero no expresa niveles detectables de MKP1, siendo la inducción de la apoptosis más tardía. Así, la regulación de JNK1/2 y p38 en las células H1299 puede deberse a la acción de otra proteína con actividad MAPK fosfatasa. Postulamos por tanto, que el CBDCA podría utilizar las mismas vías de inducción de apoptosis que las descritas para el CDDP con la única diferencia en la cinética de activación de las mismas.

Existe mucha controversia en la literatura sobre el papel de ERK1/2 en la supervivencia o inducción de apoptosis en respuesta a diferentes estímulos. En general, la activación de la cascada de ERK1/2 está implicada en tumorigénesis y proliferación celular (169, 178). Por el contrario, se ha demostrado que la activación de ERK1/2 puede participar en la apoptosis inducida por daño en el ADN en células HeLa de carcinoma cervical humano (292). Además, estudios recientes sugieren que la activación de ERK1/2 mediada por p53 es requerida en la apoptosis inducida por CBDCA en carcinoma cervical (257), y que la activación de esta quinasa por CBDCA promueve muerte celular en células de cáncer de mama (283). Nuestros resultados indican que en el CNMP la activación de ERK1/2 por CDDP no participa en la inducción de apoptosis, mientras que en el caso de CBDCA, al contrario de lo descrito para el cáncer cervical y de mama, la activación de ERK1/2 parece favorecer la supervivencia en una línea resistente de este tipo de tumores, en la que se ve una activación elevada de esta quinasa a pesar de carecer del gen p53 (233).

La activación de JNK1/2 por CDDP está mediada por la cascada MEKK1/SEK1 y está directamente relacionada y se requiere para la inducción de muerte celular (243). Análogamente, se ha demostrado que ASK1 media la muerte celular programada inducida por CDDP a través de la regulación de las vías SEK1/JNK1/2 y MKK3/p38 en células de carcinoma de ovario (62, 302). Nuestros resultados indican que en la activación de JNK1/2 en respuesta a

CBDCA participa MEKK1 y la activación de p38 por CBDCA depende principalmente de ASK1 y MKK6. A diferencia de lo que ocurre con CDDP, el CBDCA produce una activación directa de JNK1/2 por MEKK1 que podría estar mediada por quinasas diferentes a SEK1 y MKK7 y que desconocemos. Del mismo modo, el tratamiento con CBDCA induce una activación directa de MKK6 por ASK1 y esto contribuye al aumento observado en las actividades de JNK1/2 y p38. Las rutas de señalización de las MAPKs no son lineales sino que muestran una gran versatilidad en los sustratos utilizados. Por ello, aunque MEKK1 activa principalmente a SEK1 y MKK7, puede también estimular a p38 a través de la activación de MKK6 (162); al igual que ASK1 es capaz de activar a JNK1/2 a través de la fosforilación de SEK1 (62, 260), lo que contribuye a la respuesta final de la célula.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el factor de transcripción NFκB está implicado en la resistencia a CDDP promoviendo la expresión de la proteína inhibitoria de apoptosis XIAP (242). El tratamiento de la línea celular resistente derivada de CNMP H1299 con CBDCA produce un gran aumento en la activación de la vía de supervivencia NFκB que es 10 veces mayor respecto a las líneas sensibles. Estas diferencias en los niveles de transcripción dependientes de NFκB existen ya incluso en condiciones basales, ya que las células H1299 presentan unos niveles muy altos de activación del factor de transcripción. Estos resultados justifican la mayor resistencia observada en respuesta a tratamiento con CBDCA en las células H1299 respecto a las H23 y H460. En respuesta a estímulo, la activación de NFκB puede tener lugar por dos vías de señalización: la vía canónica o la vía no canónica (19, 136, 203, 269). Observamos que tras tratamiento con CBDCA la activación de la subunidad activa en transcripción de NFκB (p65) y de las IKKs (IKKα e IKKβ) cuyas actividades están implicadas principalmente con la activación de respuestas antiapoptóticas (vía canónica), es mayor en las células H1299, que es la línea celular más resistente al tratamiento con CBDCA. En las líneas celulares más sensibles, H23 y H460, existe una mayor participación de la vía no canónica (IKKα), la vía relacionada con diferenciación celular. A pesar de ello, los niveles de activación de la subunidad p65 son altos en las células H23. Esto podría deberse a la participación de mecanismos alternativos que impliquen la estimulación de la actividad transcripcional de la subunidad p65 de NFκB, ya que se ha descrito que diferentes estímulos celulares pueden activar la transcripción de NFκB mediante mecanismos independientes de la translocación nuclear de sus miembros y que dependen solo de la activación transcripcional de p65 (251). Por tanto, parte de la quimioresistencia del CNMP puede resultar de la activación constitutiva o inducida por el CBDCA de la ruta de supervivencia de NFκB, como se ha descrito para las células A549 (196), junto con la mayor activación de la vía ERK1/2. Sería necesario estudiar qué genes diana de NFκB como por ejemplo genes de la familia antiapoptótica Bcl-2, se expresan en respuesta a CBDCA.

Nuestros resultados indican que el mecanismo de inducción de muerte celular por CBDCA difiere de CDDP en las rutas de señalización activadas por ambos. La diferencia principal que hemos encontrado en las células resistentes comparadas con las sensibles es un desbalance entre las rutas de muerte y supervivencia, siendo muy relevante la activación de las vías NFκB y ERK1/2. Una posible estrategia sensibilizadora, sería la terapia combinada de CBDCA con agentes inhibidores de la ruta de NFκB tal como se ha descrito (13, 86, 100, 181), o bien con inhibidores de MEK que presentan menos efectos secundarios y ya están en fase clínica (6, 17, 104, 197, 221, 274).

3. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN EN RATONES QUE TIENEN EL ONCOGÉN K-Ras ACTIVADO.

Existen diversos trabajos en la literatura que demuestran que MKP1 desempeña un papel importante en la carcinogénesis y promoción tumoral del CNMP. Se ha descrito una expresión constitutiva de la proteína MKP1 en CNMP y un aumento en los niveles de mRNA de esta fosfatasa en tejido tumoral de CNMP comparado con tejido normal (172). También se han observado elevados niveles de expresión nuclear de MKP1 en biopsias de tumores de estadios tempranos y líneas celulares derivadas de CNMP y que la inhibición en la expresión de MKP1 en estas líneas celulares inhibe la capacidad tumorogénica (60, 201, 287). K-Ras es el principal oncogén que aparece mutado en el cáncer de pulmón y se cree que juega un papel importante en el proceso de la tumorogénesis (9, 234). Entre un 20 y un 30% de los CNMP presentan mutaciones en el gen K-Ras de las cuales, aproximadamente el 90% implican los codones 12 o 13 (92). Las mutaciones oncogénicas de K-Ras inducen la activación de varias vías de señalización antiapoptóticas que contribuyen al desarrollo del cáncer de pulmón (79). Dado que MKP1 parece desempeñar un papel importante en los estadios iniciales en el CNMP, decidimos investigar si la expresión de esta fosfatasa podría estar favoreciendo la formación y progresión de tumores de pulmón inducidos por el oncogén K-Ras *in vivo*. Para ello, utilizamos un modelo animal que no expresa la fosfatasa MKP1 y en el que se puede inducir la expresión del oncogén K-Ras por tratamiento con 4-OHT. La expresión de este oncogén en los pulmones de ratones adultos induce una rápida proliferación celular, que resulta en la formación de adenomas y adenocarcinomas (108). Por tanto, este modelo animal nos permite evaluar si MKP1 desempeña algún papel en la tumorogénesis pulmonar inducida por K-Ras.

Nuestros resultados muestran que el número de tumores inducidos por K-Ras es significativamente menor en los pulmones de los ratones que no expresan MKP1 en comparación con los ratones control. Además, el porcentaje de adenocarcinomas de pulmón de alto grado inducidos por K-Ras es mayor en los ratones que expresan la fosfatasa, lo que indica

que MKP1 promueve la progresión del cáncer de pulmón inducida por K-Ras. p38 es una de las quinasas cuya actividad es inhibida por MKP1. La ausencia de expresión de la quinasa p38 α en el mismo modelo murino en el que la expresión del oncogén K-Ras se activa mediante el tratamiento con esteroides sintéticos (K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; p38 α ^{-/-}), provocó el desarrollo acelerado de los tumores de pulmón inducidos por K-Ras que progresaron rápidamente a adenocarcinomas (285), respaldando así los resultados obtenidos en este trabajo.

La introducción de un casete reportero IRES- β -geo en el extremo 3'UTR del locus del oncogén K-Ras4B nos permite monitorizar la expresión de alelo oncogénico mediante tinción específica de LacZ con X-Gal. El análisis por tinción de X-Gal de las secciones obtenidas a partir de los pulmones de los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{+/+} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-} tratados con 4-OHT, muestra que el tamaño y número de los grupos de células β -geo⁺ presentes en los pulmones de los ratones que no expresan MKP1 es menor que en aquellos que expresan la fosfatasa, lo que indica que la ausencia de MKP1 puede estar comprometiendo la supervivencia y/o progresión de las células que portan la mutación oncogénica K-Ras^{V12}.

El conjunto de estos resultados, junto con lo descrito previamente por nuestro laboratorio y por otros autores que demuestra que MKP1 se expresa en un gran número de tumores de CNMP en estadio iniciales (60, 287), sugieren que MKP1 es un potente promotor tumoral en cáncer de pulmón.

La activación del oncogén K-RasD12 por instilación de adeno Cre (130) o del oncogén K-RasV12 por tratamiento con 4-OHT (108) induce el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas pulmonares que son positivos para el marcador Prosurfactant C (SPC), marcador de neumocitos tipo II. Todos los adenomas y adenocarcinomas pulmonares desarrollados en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{+/+} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; mkp1^{-/-} que hemos analizados han resultado ser también 100% positivos para SPC y negativos para CC10, lo que indica que la inactivación de MKP1 no altera la naturaleza de estas lesiones ni del resto de los tipos celulares estudiados presentes en el pulmón fuera de las lesiones: las células Clara presentes en el epitelio bronquiolar y las células alveolares neumocitos tipo II (AT2). Sin embargo, en la actualidad existe una gran controversia acerca del origen celular de estas lesiones. Se ha descrito la existencia en los pulmones de unas células denominadas BASCs (bronchioalveolar stem cells) que presentan propiedades de células stem y que han sido propuestas como las células progenitoras de las células Clara y AT2 (149). La expresión del oncogén K-Ras induce la amplificación de las células BASCs resultando en el desarrollo de adenocarcinomas pulmonares (149). Se ha demostrado que la inactivación condicional de p38 α en el modelo K-Ras^{+V12}; RERT^{+/ert}; p38 α ^{-/-} da lugar a una amplificación y deslocalización de las células BASCs en los pulmones de los ratones que no expresan la quinasa, y que se correlacionan con un aumento de

la tumorigénesis inducida por el oncogén K-Ras en dichos ratones (285). Basándonos en esto podemos pensar que el menor número de tumores inducidos por K-Ras en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} podría deberse a que los pulmones de estos ratones presenten un menor número de células BASCs debido a que en ausencia de MKP1 el oncogén K-Ras no sea capaz de inducir eficientemente la amplificación de dichas células. Futuros estudios indagarán esta posibilidad.

Se ha demostrado que en los adenomas pulmonares la expresión de la forma oncogénica de K-Ras activa preferentemente la vía mitogénica Raf/MEK/ERK frente a la vía de supervivencia PI3K/PDK/AKT (108). Nuestros resultados muestran que la expresión de MKP1 favorece la activación de ERK1/2 en las lesiones pulmonares inducidas por K-Ras. La quinasa ERK1/2 está relacionada con proliferación celular y progresión tumoral, por lo que el mayor número, grado y tamaño de los tumores desarrollados en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} podría deberse a la mayor activación de la vía ERK1/2 en dichos ratones. Sin embargo, no existe correlación entre el patrón de expresión de pERK1/2 y una mayor actividad proliferativa en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+}, estudiada mediante inmunohistoquímica con el marcador de proliferación Ki67. Es más, parece que la proliferación se relaciona más con el grado de la lesión que con el genotipo. Para determinar con total seguridad si existen diferencias en el grado de proliferación de las lesiones pulmonares entre los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} será necesario realizar un conteo del número de células positivas para el marcador de proliferación Ki67.

El estudio de la expresión del marcador de apoptosis caspasa 3 en las lesiones desarrolladas por los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} revela que no hay apoptosis en ninguno de los genotipos, al menos a los tiempos estudiados. Lo que sugiere que las diferencias observadas en el número y tamaño de las lesiones no se deben a que exista una menor muerte celular en los ratones que expresan MKP1. Será necesario estudiar el papel de la apoptosis en estadios iniciales de la enfermedad, que pudieran explicar la existencia no sólo de menos lesiones, sino de menos grupos de células expresando el oncogén en los tiempos estudiados en este trabajo.

Existen diversos estudios en la literatura que relacionan una menor señalización de la vía ERK1/2 con la senescencia inducida por Ras (51, 97). Se ha descrito que las lesiones pulmonares premalignas (adenomas) son senescentes. Dichas lesiones dejan de ser senescentes y progresan a tumores malignos (adenocarcinomas) al perder genes supresores tumorales como son p53 y p19ARF (46). En nuestro modelo, el posible papel de senescencia inducido o potenciado por la pérdida de expresión de MKP1, podría explicar el menor número de lesiones de bajo grado (adenomas) y la menor progresión a lesiones de alto grado (adenocarcinomas).

Además, se ha descrito que la inactivación de la proteína cdk4 en presencia del oncogén K-Ras induce una respuesta senescente que impide la aparición de lesiones pulmonares (225). Sería aconsejable estudiar la senescencia inducida por MKP1 en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{+/+} y K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} ya que es razonable pensar que la ausencia de MKP1 podría estar induciendo un mayor grado de senescencia en los ratones que expresan el oncogén K-Ras, el cual podría ser responsable de la menor inducción y progresión de las lesiones presentes en los pulmones de los ratones que no expresan la fosfatasa.

Otro posible mecanismo por el que MKP1 favorece la formación y desarrollo de tumores pulmonares inducidos por K-Ras, podría ser una mayor eficiencia de transformación celular inducida por el oncogén K-Ras que podría verse favorecida en presencia de la fosfatasa. Existe un gran número de evidencias bibliográficas que apoyan la implicación de las tres principales vías de las MAPKs, ERK1/2, JNK1/2 y p38, cuya actividad es regulada por MKP1, en la transformación inducida por Ras. Así, se ha demostrado que la activación de la vía Raf/MEK/ERK induce la transformación celular mediada por Ras (224) y que la expresión de las quinasas mutantes Raf-1 y MEK bloquean la transformación inducida por Ras en células NIH3T3 (224). También se ha descrito que la activación constitutiva de las vías Raf/MEK/ERK y JNK en las células HT1080 de fibrosarcoma humano es necesaria para la transformación inducida por Ras (223). Del mismo modo, se ha observado que la función del factor de transcripción c-Jun, el principal sustrato de JNK, es requerida para la inducción de transformación celular por Ras en fibroblastos murinos (148) y que el dominante negativo de SEK1, una quinasa activadora de JNK, bloquea la transformación mediada por Ras en células NIH3T3 (148). Por el contrario, la activación de p38 bloquea la transformación inducida por Ras en células NIH3T3 (147) y estudios realizados en fibroblastos murinos sugieren que p38 actúa como un regulador negativo de la transformación mediada por Ras (148). Por tanto, la posible menor eficiencia de transformación celular inducida por K-Ras en los ratones K-Ras^{+V12}; RERT^{+ert}; mkp1^{-/-} que sería responsable del menor número de lesiones desarrolladas en los pulmones de dicho ratones, podría deberse al importante papel que desempeñan las vías de señalización de la familia MAPK reguladas por MKP1 en la transformación celular inducida por K-Ras.

En esta memoria se demuestra que MKP1 favorece el desarrollo de tumores de pulmón en ratones que expresan el oncogén K-Ras mediante un aumento en la activación de la vía de señalización relacionada con progresión tumoral, ERK1/2. Alternativamente, este proceso podría verse favorecido por una menor senescencia inducida por K-Ras en presencia de la fosfatasa o por una mayor eficiencia de transformación celular mediada por dicho oncogén en los ratones que expresan MKP1.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MKP1 EN LA TUMOROGÉNESIS Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PIEL EN RATONES DEFICIENTES EN MKP1 Y EN TUMORES HUMANOS.

Dependiendo del tipo de tumor existe la posibilidad de que MKP1 pueda actuar como promotor o supresor tumoral (22, 32, 110, 298) al igual que ha sido descrito para las quinasas p38 y JNK1/2 (288). Para analizar el papel de MKP1 en el inicio y desarrollo del cáncer cutáneo hemos utilizado el modelo de carcinogénesis química de piel de ratón. Este modelo fue el primero en definir el carácter secuencial de la carcinogénesis, anticipándose a conceptos esenciales como la iniciación, promoción y progresión maligna, aplicados posteriormente al cáncer humano (303). La carcinogénesis contiene una serie de etapas definidas, como alteraciones específicas en protooncogenes o genes supresores tumorales (3, 141). Además, ocurren cambios en la expresión de diferentes proteínas, entre ellas las MAPKs (316) cuya actividad es regulada por MKP1.

En este trabajo se demuestra que la ausencia de MKP1 es determinante en el crecimiento tumoral *in vivo*. La falta de expresión de MKP1 tiene efectos claros en la carcinogénesis de piel, afectando tanto a los estadios tempranos de la tumorogénesis, como a los tardíos. Los ratones que expresan MKP1 muestran mayor latencia tumoral y una reducción significativa de la incidencia y multiplicidad de los tumores cutáneos en comparación con los ratones que no expresan la fosfatasa. Este fenotipo es idéntico al mostrado por los ratones transgénicos que no expresan p38 δ en la epidermis que sirvieron para demostrar el papel esencial de p38 δ en la carcinogénesis *in vivo* (249). La deficiencia de p38 δ en la epidermis de los ratones da lugar a un retraso en el desarrollo de los tumores de piel y una significativa reducción del número y tamaño de los tumores en comparación con los ratones que presentan el genotipo salvaje. MKP1 bloquea la expresión de p38 y ha sido relacionada con la disminución de los niveles de expresión de p38 δ inducidos por hipertonidad en células HEK293T (313). Estos resultados apoyan los obtenidos en esta tesis para ratones que no expresan MKP1 y que sugieren que MKP1 actúa como un supresor tumoral en cáncer de piel.

El modelo de carcinogénesis química de piel de ratón reproduce las diferentes etapas del desarrollo tumoral, desde que se inicia como un papiloma benigno hasta que se convierte en un carcinoma fusocelular, pasando por SCC *in situ* y SCC invasivo (153). El estudio histológico de los tumores desarrollados en las pieles de los ratones que no expresan MKP1 indica que el 100% de estos tumores corresponden a carcinomas escamosos invasivos, los cuales se han desarrollado a través de las distintas etapas de evolución tumoral diferenciadas en el modelo de carcinogénesis química de piel de ratón. Así, el tumor maligno se origina a partir de un papiloma benigno, que evoluciona a papiloma escamoso con displasia, éste progresa a

carcinoma escamoso *in situ* y finalmente, se produce la conversión a carcinoma escamoso invasivo. Por el contrario, las lesiones que presentan las pieles de los ratones que expresan la fosfatasa son en todos los casos papilomas benignos, y tan solo uno de ellos es un carcinoma escamoso *in situ*.

En tumores humanos se ha encontrado una sobreexpresión de la fosfatasa MKP1 en cáncer de mama (180, 237, 289), páncreas (171), gástrico (18) y CNMP (287), mientras que en carcinoma hepatocelular o testicular su expresión está disminuida (67, 184). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias acerca del comportamiento de MKP1 en cáncer de piel no melanoma.

En este trabajo se aporta el primer estudio de los niveles de expresión de la fosfatasa MKP1 en un amplio número de muestras de pacientes diagnosticados con BCC y SCC. Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de MKP1 es significativamente menor en el cáncer de piel humano. En este sentido, se ha observado que en todos los casos la expresión de MKP1 se encuentra disminuida en las muestras tumorales respecto al tejido epidermal normal. Estos resultados son comparables con los obtenidos para los miembros de la familia MAPK (ERK1/2 (310), p38 δ (111) y JNK1/2 (139, 308) cuya actividad bloquea MKP1, los cuales se encuentran activados en SCC humano, reforzando así los hallazgos obtenidos.

Estos resultados son respaldados por los obtenidos en el modelo de carcinogénesis química de piel de ratón, ya que existe una correlación entre la ausencia de expresión de MKP1 en los tumores cutáneos desarrollados en los ratones tratados químicamente, y la disminución en los niveles de expresión de la fosfatasa en las muestras de pacientes con BCC y SCC.

Una de las principales enfermedades precancerosas de la piel es la Enfermedad de Bowen o carcinoma de célula escamosa *in situ*. Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de una acantosis epidérmica con presencia de queratinocitos atípicos, con alteración de la morfología normal, pérdida de polaridad y ausencia de maduración y mitosis que afectan a todo el espesor de la epidermis (307), y se considera una etapa previa a la formación del carcinoma de célula escamosa invasivo, ya que alrededor del 5% de los casos progresa hacia carcinoma epidermoide invasor (307). En este trabajo hemos observado que el tratamiento cutáneo con DMBA, pero no con TPA, de ratones *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}*, además de inducir hiperplasia epidermal produce alteraciones en la organización de la epidermis de dichos ratones. Esta displasia es mucho mayor en los ratones *mkp1^{-/-}* respecto a los que expresan la fosfatasa, y es mucho más acusada tras un mayor número de tratamientos con el agente carcinógeno. Las características histológicas de estas alteraciones son las mismas descritas en la Enfermedad de Bowen, lo que indica que la ausencia de MKP1 en ratones favorece la formación de lesiones precancerosas en respuesta al tratamiento con DMBA, que posteriormente pueden evolucionar a SCC invasivo

quizás tras el tratamiento con un agente promotor tumoral, como hemos observado que ocurre en ratones *mkp1^{-/-}* que han sido sometidos al protocolo de iniciación y progresión tumoral.

La K10 es una de las queratinas que se expresan en la capa espinosa de la epidermis y se utiliza como marcador de diferenciación temprana en el proceso de queratinización (82, 200). La involucrina y loricrina, en cambio, son marcadores de diferenciación terminal de los queratinocitos ya que se expresan en la capa granular de la epidermis (43, 81-82, 252). La expresión de K10 en la epidermis de ratones *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}* neonatos no presenta diferencias significativas entre sí. Por el contrario, la expresión de loricrina e involucrina en la epidermis de ratones recién nacidos que no expresan MKP1 es mucho menor que en la piel de los ratones neonatos que presentan el genotipo silvestre. Se ha descrito que el desarrollo multiseccional de SCC está asociado con una serie de alteraciones fenotípicas que tiene lugar en las células epidermales (306). Así, en piel normal la K10 se expresa abundantemente en la capa espinosa, mientras que la loricrina e involucrina lo hacen en la capa granular. En tumores benignos inducidos químicamente se mantiene el patrón de expresión de las tres proteínas pero disminuyen sus niveles de expresión, siendo éstos muchos menores en carcinomas. En ratones *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}* adultos sometidos al protocolo de inducción química de tumores en dos etapas, la expresión de los tres marcadores de diferenciación siguen el patrón descrito en la literatura tanto en piel normal, como en papilomas y carcinomas, no encontrándose diferencias significativas en la expresión de los mismos entre las epidermis de los ratones de ambos genotipos, a diferencia de lo que ocurre en ratones neonatos. Por tanto, la ausencia de MKP1 produce, en las primeras etapas de vida del ratón, alteraciones en el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos epidermales que no tienen lugar cuando el animal es adulto, lo que sugiere que MKP1 controla el proceso de diferenciación epidermal durante las primeras etapas de vida del ratón y que este control se pierde cuando el animal es adulto. En los últimos años se han identificado múltiples vías de señalización que son esenciales para la correcta diferenciación epidermal y entre las que se encuentran las MAPKs (25-26, 83, 157). La estimulación de los queratinocitos con calcio extracelular induce la diferenciación de éstos mediante una activación rápida y transitoria de la vía Raf/MEK/ERK (250). Del mismo modo, la activación de p38 δ por diferentes estímulos induce el proceso de diferenciación epidermal (84-85), mientras que la inhibición de p38 α (84) o JNK1/2 (98) es suficiente para iniciar el programa de diferenciación en los queratinocitos de la epidermis. Cuando estudiamos la expresión de los niveles basales proteicos de las diferentes MAPKs en ratones que no expresan MKP1, no observamos cambios significativos en la expresión de las proteínas p38 y JNK1/2 en la epidermis de los ratones de ambos genotipos. Sin embargo, sí observamos un aumento en los niveles de expresión de ERK1/2 en la epidermis de los ratones *mkp1^{-/-}* respecto a la de los ratones que expresan la fosfatasa. Esto indica que en condiciones basales MKP1 podría estar

regulando el proceso de diferenciación de los queratinocitos a través de la vía de ERK1/2. Esta podría ser la primera evidencia de que MKP1 está implicada en la regulación de la diferenciación epidermal, ya que aunque se ha descrito que MKP1 participa en la regulación de la diferenciación de otros sistemas celulares, como las células del músculo esquelético (21) o los adipocitos (241), no existen evidencias en la literatura que relacionen a MKP1 con la diferenciación de las células epidermales.

El tratamiento de la piel de ratones *mkp1^{-/-}* con DMBA o TPA no tiene ningún efecto sobre la activación de las quinasas de muerte JNK1/2 y p38 respecto a la piel de ratones que expresan la fosfatasa. Sin embargo, ERK1/2, una de las principales quinasas relacionadas con proliferación celular y promoción tumoral, presenta una mayor activación en la epidermis de los ratones que no expresan MKP1 tratados con TPA. Curiosamente, la mayor carcinogénesis observada en la piel de ratones *mkp1^{-/-}* se correlaciona con un aumento en la hiperplasia epidermal y proliferación celular tras ser tratados con TPA. En este sentido, cabe señalar que la delección de ERK1 en la epidermis de ratones inhibe la carcinogénesis de piel inducida por DMBA/TPA (31). Por otra parte, una disminución en la activación de la vía ERK1/2-AP1 se correlaciona con una reducción del desarrollo de tumores de piel estimulados por DMBA/TPA en ratones nulos para JNK2 (61), mientras que un aumento en la señalización de ERK1/2-AP1 favorece la carcinogénesis química de piel en ratones que no expresan JNK1 (255). También se ha descrito que la mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores inducidos por DMBA/TPA en ratones que expresan p38δ en la epidermis, se corresponde con una mayor activación de la vía ERK1/2-AP1 (249). Estos estudios apoyan nuestros resultados, pues dado que MKP1 regula negativamente la actividad de ERK1/2, JNK1/2 y p38, es lógico pensar que la ausencia de expresión de esta fosfatasa favorece el desarrollo de tumores de piel mediante la activación de la vía de supervivencia ERK1/2. Estos hallazgos, por tanto, sugieren que una disminución de la respuesta proliferativa en la promoción tumoral puede limitar el crecimiento del tumor y, por lo tanto, representa una importante protección contra la carcinogénesis de piel observada en este modelo murino.

El factor de transcripción Stat3 está constitutivamente activado en muchos tumores humanos y desempeña un papel importante en carcinogénesis (150, 256). Varios estudios recientes muestran que Stat3 está implicado en la tumorogénesis de piel inducida químicamente y con radiación UVB (58-59, 137, 150, 245). A pesar de ello, no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de este factor de transcripción en la piel de ratones *mkp1^{+/+}* y *mkp1^{-/-}* que han sido sometidos a un tratamiento corto (3 horas) con DMBA o TPA o a un tratamiento agudo (dosis repetidas de DMBA o TPA durante 4 días) con ambos agentes químicos. Sin embargo, sí hemos observado un aumento en la expresión de p53 en los papilomas y carcinomas desarrollados por los ratones que no expresan MKP1 sujetos al

protocolo de carcinogénesis química. El gen p53 es ampliamente conocido por su importante función como supresor tumoral y se encuentra mutado en el 80% de los cánceres humanos (125). La mayoría de estas mutaciones dan lugar a la pérdida de función de p53, lo cual está relacionado con el control del ciclo celular y apoptosis (266). Sin embargo, estudios recientes indican que algunas de estas mutaciones pueden producir la pérdida de la función antitumoral de p53 haciendo que éste adquiera nuevas funciones oncogénicas, conocidas como ganancia de función (gain-of-function, GOF), que regulan activamente la migración celular, invasión y metástasis, en parte interfiriendo con la función de p63, otro miembro de la familia p53 (204, 217). Concretamente en cáncer de piel existe una gran controversia acerca del papel que desempeña p53 en la carcinogénesis y progresión de este tipo de tumores. Por un lado, se ha descrito que la ausencia de expresión de p53 en el epitelio estratificado induce el desarrollo de SCC espontáneo mediante la activación de la vía AKT, lo que favorece la proliferación y angiogénesis tumoral (188). Este proceso además, es acelerado por la ausencia de expresión del gen Rb (188). También se ha observado que el tratamiento con DMBA/TPA de la epidermis de ratones nulos para p53 no favorece la iniciación o promoción tumoral, pero sí aumenta la progresión maligna (142). Por otro lado, se ha descrito que la epidermis de ratones p53^{-/-} muestran resistencia a la carcinogénesis temprana (papilomatogénesis) tras exposición tópica al protocolo de carcinogénesis química (142), y que el tratamiento con DMBA/TPA de ratones que no presentan ninguna alteración genética induce el desarrollo de tumores cutáneos y un aumento significativo de la expresión de p53 en dichos tumores (138). Además, ensayos *in vitro* sugieren que la expresión de p53 desempeña un papel importante en las etapas tempranas de la promoción tumoral, ya que el tratamiento con TPA de las células epidermales sensibles a promoción tumoral JB6 P+ induce la expresión temprana de p53 en comparación a las células resistentes JB6 P- (235). Nuestros resultados están de acuerdo con estos últimos datos, lo que nos hace pensar que el aumento observado en los niveles de expresión de p53 en los papilomas y carcinomas de los ratones mkp1^{-/-} sometidos al protocolo de carcinogénesis química, está relacionado con la mayor sensibilidad de estos ratones al desarrollo tumoral en respuesta al tratamiento con agentes carcinógenos, y por tanto, contribuye junto con la vía de ERK1/2 a la carcinogénesis de piel en ratones que no expresan MKP1.

En esta tesis se demuestra que la susceptibilidad al desarrollo de tumores cutáneos en el modelo de carcinogénesis química de piel asociado con mutaciones del oncogén H-Ras es mayor en ausencia de MKP1. Nuestros datos sugieren que el mecanismo por el que se produce una mayor susceptibilidad a los carcinógenos en ratones que no expresan MKP1, es una alteración de la respuesta proliferativa asociada con un aumento en la señalización de una de las principales vías promotoras de la transformación tumoral, ERK1/2, y de la vía p53. Estos hallazgos sugieren por primera vez un papel *in vivo* de MKP1 como supresor tumoral en la

carcinogénesis epidermal, papel que es apoyado por el hecho de que la expresión de MKP1 se encuentra disminuida en SCC y BCC humano. El conocimiento de los mecanismos que modulan la pérdida de la expresión de MKP1 en cáncer de piel, tales como la metilación del promotor o la expresión de miARNs que tengan como diana MKP1, pueden dar la luz para nuevos tratamientos preventivos del cáncer de piel.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La función de MKP1 es específica para la regulación de la apoptosis inducida por agentes alquilantes mediante la regulación de la actividad de JNK1/2 y p38, pudiendo ser un importante mediador de quimioresistencia.
2. La resistencia a CBDCA en CNMP se correlaciona con la activación de la ruta de supervivencia ERK1/2, mientras que la sensibilidad al mismo se correlaciona con la inducción de muerte celular por activación de las rutas JNK1/2 y p38.
3. El CBDCA produce una activación directa de JNK1/2 por MEKK1 que podría estar mediada por quinasas diferentes a SEK1 y MKK7; y una activación indirecta de esta quinasa a través de la vía ASK1/MKK6, que a su vez media la activación de p38 en respuesta al fármaco.
4. El CBDCA induce la activación de la ruta de supervivencia de NFkB en las células resistentes de CNMP, favoreciendo así la quimioresistencia de este tipo de tumores al tratamiento con el fármaco.
5. La expresión de MKP1 contribuye al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas pulmonares inducidos por el oncogén K-Ras, muy probablemente aumentando la activación de la vía ERK1/2.
6. La inactivación de MKP1 no parece alterar la naturaleza celular de los bronquiolos ni de los alveolos. Las lesiones de pulmón desarrolladas en los ratones *mkp1^{+/+}* expresan el marcador SPC igual que las lesiones desarrolladas en los pulmones de los ratones que no expresan la fosfatasa.
7. El origen del menor número de lesiones y la presencia de un menor número de células expresando el oncogén K-Ras en ratones *mkp1^{-/-}* podría deberse a diferentes mecanismos, no excluyentes, como son, disminución de la supervivencia y/o transformación celular por el oncogén K-Ras, la presencia de un menor número de células BASCs en los pulmones de dichos ratones y/o aumento de la senescencia en células que expresan el oncogén K-Ras. Otros mecanismos también podrían ser diferente grado de proliferación y apoptosis.

- 8. La ausencia de expresión de MKP1 en ratones sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA favorece el desarrollo de tumores de piel y aumenta significativamente la progresión y conversión maligna. Así mismo, la expresión de MKP1 es significativamente menor en el carcinoma basocelular (BCC) y escamoso (SCC) humano en relación al tejido normal.**
- 9. La mayor sensibilidad al desarrollo de tumores mostrada por la piel de ratones que no expresan MKP1 parece deberse a una alteración de la respuesta proliferativa asociada con un aumento en la señalización de las vías ERK1/2 y p53.**

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

1. Epidemiología del Cáncer de Pulmón en España y en el mundo occidental. http://www.cancerpulmon.es/mas_informacion_5.html.
2. World Health Organization. World Health Statistics 2008. 2008.
3. **Akhurst RJ, and Balmain A.** Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol* 187: 82-90, 1999.
4. **Al Zaid Siddiquee K, and Turkson J.** STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 18: 254-267, 2008.
5. **Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, and Mustelin T.** Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711, 2004.
6. **Amran D, Sancho P, Fernandez C, Esteban D, Ramos AM, de Blas E, Gomez M, Palacios MA, and Aller P.** Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation. *Biochim Biophys Acta* 1743: 269-279, 2005.
7. **Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, and Jaggi R.** Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 85: 1040-1050, 2005.
8. **Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, and Matsubara Y.** The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 29: 992-1006, 2008.
9. **Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, and Tsao MS.** K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 8: 30-38, 2006.
10. **Avruch J.** MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1150-1160, 2007.
11. **Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, and Zhang XF.** Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research* 56: 127, 2001.
12. **Baker SJ, and Reddy EP.** Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270, 1998.
13. **Baldwin AS.** Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *Journal of Clinical Investigation* 107: 241-246, 2001.
14. **Balmain A, and Brown K.** Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 51: 147-182, 1988.
15. **Balmain A, and Harris CC.** Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* 21: 371-377, 2000.
16. **Balmain A, and Pragnell IB.** Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* 303: 72-74, 1983.
17. **Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, Jackson C, and Van Waes C.** Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF B and AP 1 activation and IL 8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *International journal of cancer* 99: 538-548, 2002.
18. **Bang YJ, Kwon JH, Kang SH, Kim JW, and Yang YC.** Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 43-47, 1998.

19. **Basseres DS, and Baldwin AS.** Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25: 6817-6830, 2006.
20. **Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, Gallardo E, Carles J, Mendez P, de la Cruz JJ, Taron M, Rosell R, and Baselga J.** Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 18: 522-528, 2007.
21. **Bennett AM, and Tonks NK.** Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* 278: 1288-1291, 1997.
22. **Bermudez O, Pages G, and Gimond C.** The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C189-202, 2010.
23. **Bizub D, Wood AW, and Skalka AM.** Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6048, 1986.
24. **Bizub D, Wood AW, and Skalka AM.** Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6048-6052, 1986.
25. **Blanpain C, and Fuchs E.** Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 207-217, 2009.
26. **Blanpain C, and Fuchs E.** Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 339-373, 2006.
27. **Bluher M, Bashan N, Shai I, Harman-Boehm I, Tarnowski T, Avinaoch E, Stumvoll M, Dietrich A, Kloting N, and Rudich A.** Activated Ask1-MKK4-p38MAPK/JNK stress signaling pathway in human omental fat tissue may link macrophage infiltration to whole-body Insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 2507-2515, 2009.
28. **Bogoyevitch MA, and Arthur PG.** Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? *Biochim Biophys Acta* 1784: 76-93, 2008.
29. **Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, and Greenberg ME.** Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science* 286: 1358, 1999.
30. **Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, and Yancopoulos GD.** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675, 1991.
31. **Bourcier C, Jacquel A, Hess J, Peyrottes I, Angel P, Hofman P, Auberger P, Pouyssegur J, and Pages G.** p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis. *Cancer Res* 66: 2700-2707, 2006.
32. **Boutros T, Chevet E, and Metrakos P.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60: 261-310, 2008.
33. **Boutwell RK.** The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 2: 419-443, 1974.
34. **Bradham C, and McClay DR.** p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* 5: 824-828, 2006.
35. **Brahimi-Horn MC, Chiche J, and Pouyssegur J.** Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 85: 1301-1307, 2007.

36. **Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, and Metzger D.** Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14559-14563, 1997.
37. **Brown K, Buchmann A, and Balmain A.** Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 538-542, 1990.
38. **Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, and Kaina B.** Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer* 112: 974-985, 2004.
39. **Buchholz TA, Garg AK, Chakravarti N, Aggarwal BB, Esteva FJ, Kuerer HM, Singletary SE, Hortobagyi GN, Pusztai L, Cristofanilli M, and Sahin AA.** The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 11: 8398-8402, 2005.
40. **Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, and Balmain A.** Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6: 2363-2369, 1991.
41. **Campbell JS, Seger R, Graves JD, Graves LM, Jensen AM, and Krebs EG.** The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 50: 131-159, 1995.
42. **Campling BG, and el-Deiry WS.** Clinical implications of p53 mutations in lung cancer. *Methods Mol Med* 75: 53-77, 2003.
43. **Candi E, Schmidt R, and Melino G.** The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328-340, 2005.
44. **Caulin C, Nguyen T, Lang GA, Goepfert TM, Brinkley BR, Cai WW, Lozano G, and Roop DR.** An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J Clin Invest* 117: 1893-1901, 2007.
45. **Cohen P.** Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* 21: 317-324, 2009.
46. **Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, and Barbacid M.** Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642-642, 2005.
47. **Collins LG, Haines C, Perkel R, and Enck RE.** Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 75: 56-63, 2007.
48. **Cortes-Sempere M, Chattopadhyay S, Rovira A, Rodriguez-Fanjul V, Belda-Iniesta C, Tapia M, Cejas P, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Sanchez-Perez I, Nistal M, Moratilla C, de Castro-Carpeno J, Gonzalez-Baron M, Albanell J, and Perona R.** MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 286: 206-216, 2009.
49. **Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, and Gutkind JS.** The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81: 1137-1146, 1995.
50. **Coulombe P, and Meloche S.** Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1773: 1376-1387, 2007.
51. **Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, Hollstein PE, MacCollin M, and Cichowski K.** A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10: 459-472, 2006.

52. **Crews CM, Alessandrini A, and Erikson RL.** The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480, 1992.
53. **Crino L, Foglietta J, and Hamzaj A.** Lung cancer. *J Thorac Oncol* 2: S24-26, 2007.
54. **Crystal AS, and Shaw AT.** New Targets in Advanced NSCLC: EML4-ALK. *Clin Adv Hematol Oncol* 9: 207-214, 2011.
55. **Cuenda A, Alonso G, Morrice N, Jones M, Meier R, Cohen P, and Nebreda AR.** Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J* 15: 4156-4164, 1996.
56. **Cuenda A, and Dorow DS.** Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochemical Journal* 333: 11, 1998.
57. **Cuenda A, and Rousseau S.** p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375, 2007.
58. **Chan K, Sano S, Kataoka K, Abel E, Carbajal S, Beltran L, Clifford J, Peavey M, Shen J, and Digiovanni J.** Forced expression of a constitutively active form of Stat3 in mouse epidermis enhances malignant progression of skin tumors induced by two-stage carcinogenesis. *Oncogene* 27: 1087-1094, 2007.
59. **Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, and DiGiovanni J.** Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 114: 720-728, 2004.
60. **Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, Fresno-Vara JA, de Castro-Carpeno J, Casado E, Nistal M, Gonzalez-Baron M, and Perona R.** MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25: 3335-3345, 2006.
61. **Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA, and Dong Z.** Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res* 61: 3908-3912, 2001.
62. **Chen Z, Seimiya H, Naito M, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Imaizumi M, Ichijo H, Miyazono K, and Tsuruo T.** ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18: 173-180, 1999.
63. **Darwiche N, Celli G, Tennenbaum T, Glick AB, Yuspa SH, and De Luca LM.** Mouse skin tumor progression results in differential expression of retinoic acid and retinoid X receptors. *Cancer Res* 55: 2774-2782, 1995.
64. **Dashti SR, Efimova T, and Eckert RL.** MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem* 276: 8059-8063, 2001.
65. **de Seranno S, and Meuwissen R.** Progress and applications of mouse models for human lung cancer. *Eur Respir J* 35: 426-443, 2010.
66. **Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, and Alessi DR.** Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17: 4426-4441, 1998.
67. **Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A, Lichtenegger W, Dietel M, and Hauptmann S.** Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 102: 507-513, 2002.

68. **DePinho RA, and Jacks T.** Introduction. The laboratory mouse in cancer research. *Semin Cancer Biol* 11: 175-176, 2001.
69. **Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, and Davis RJ.** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037, 1994.
70. **Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, and Davis RJ.** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267: 682-685, 1995.
71. **Dhanasekaran DN, and Reddy EP.** JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27: 6245-6251, 2008.
72. **Dickinson RJ, and Keyse SM.** Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci* 119: 4607-4615, 2006.
73. **DiGiovanni J.** Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 54: 63-128, 1992.
74. **Domann FE, Jr., Levy JP, Finch JS, and Bowden GT.** Constitutive AP-1 DNA binding and transactivating ability of malignant but not benign mouse epidermal cells. *Mol Carcinog* 9: 61-66, 1994.
75. **Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira SA, and Bravo R.** Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene* 13: 925-931, 1996.
76. **Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, Harada M, Kinoshita I, Xu HJ, Kuzumaki N, Kawakami Y, and Benedict WF.** Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 79: 1329-1337, 1997.
77. **Downward J.** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 11-22, 2003.
78. **Dreskin SC, Thomas GW, Dale SN, and Heasley LE.** Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J Immunol* 166: 5646-5653, 2001.
79. **Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Janne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanoovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S, and Hillan KJ.** Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23: 5900-5909, 2005.
80. **Eberhardt W, Stamatis G, Stuschke M, Wilke H, Muller MR, Kolks S, Flasshove M, Schutte J, Stahl M, Schlenger L, Budach V, Greschuchna D, Stuben G, Teschler H, Sack H, and Seeber S.** Prognostically orientated multimodality treatment including surgery for selected patients of small-cell lung cancer patients stages IB to IIIB: long-term results of a phase II trial. *Br J Cancer* 81: 1206-1212, 1999.
81. **Eckert RL, Crish JF, Efimova T, Dashti SR, Deucher A, Bone F, Adhikary G, Huang G, Gopalakrishnan R, and Balasubramanian S.** Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol* 123: 13-22, 2004.
82. **Eckert RL, Crish JF, and Robinson NA.** The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological reviews* 77: 397, 1997.
83. **Eckert RL, Efimova T, Dashti SR, Balasubramanian S, Deucher A, Crish JF, Sturniolo M, and Bone F.** Keratinocyte survival, differentiation, and death: many

roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 7: 36-40, 2002.

84. **Efimova T.** p38delta mitogen-activated protein kinase regulates skin homeostasis and tumorigenesis. *Cell Cycle* 9: 498-405, 2010.

85. **Efimova T, Broome AM, and Eckert RL.** A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* 278: 34277-34285, 2003.

86. **Epinat JC, and Gilmore TD.** Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* 18: 6896, 1999.

87. **Ewing MW, Conti CJ, Kruszewski FH, Slaga TJ, and DiGiovanni J.** Tumor progression in Sencar mouse skin as a function of initiator dose and promoter dose, duration, and type. *Cancer Res* 48: 7048-7054, 1988.

88. **Festing MF, Lin L, Devereux TR, Gao F, Yang A, Anna CH, White CM, Malkinson AM, and You M.** At least four loci and gender are associated with susceptibility to the chemical induction of lung adenomas in A/J x BALB/c mice. *Genomics* 53: 129-136, 1998.

89. **Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, and Conti CJ.** Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9: 3627-3633, 1994.

90. **Fong K, Sekido Y, Gazdar A, and Minna J.** Lung cancer• 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58: 892, 2003.

91. **Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi H, Angeletti CA, Pingitore R, Pepe S, Basolo F, and Bevilacqua G.** Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *Eur J Cancer* 31A: 178-183, 1995.

92. **Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Wooster R, and Futreal P.** COSMIC 2005. *British journal of cancer* 94: 318-322, 2006.

93. **Frame S, Crombie R, Liddell J, Stuart D, Linardopoulos S, Nagase H, Portella G, Brown K, Street A, Akhurst R, and Balmain A.** Epithelial carcinogenesis in the mouse: correlating the genetics and the biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 839-845, 1998.

94. **Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, and Saklatvala J.** Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78: 1039-1049, 1994.

95. **Fukunaga R, and Hunter T.** MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 16: 1921-1933, 1997.

96. **Galabova-Kovacs G, Kolbus A, Matzen D, Meissl K, Piazzolla D, Rubiolo C, Steinitz K, and Baccarini M.** ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 5: 1514-1518, 2006.

97. **Gaumont-Leclerc MF, Mukhopadhyay UK, Goumard S, and Ferbeyre G.** PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *Journal of Biological Chemistry* 279: 46802, 2004.

98. **Gazel A, Banno T, Walsh R, and Blumenberg M.** Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281: 20530-20541, 2006.

99. **Gilmore TD.** Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680-6684, 2006.

100. **Gilmore TD, and Herscovitch M.** Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25: 6887-6899, 2006.

101. **Girard L, Zochbauer-Muller S, Virmani AK, Gazdar AF, and Minna JD.** Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* 60: 4894-4906, 2000.
102. **Glick AB, Kulkarni AB, Tennenbaum T, Hennings H, Flanders KC, O'Reilly M, Sporn MB, Karlsson S, and Yuspa SH.** Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6076-6080, 1993.
103. **Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, and Cohen P.** Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J* 16: 3563-3571, 1997.
104. **Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, and Kelley SL.** Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol* 33: 392-406, 2006.
105. **Greenhalgh DA, Welty DJ, Player A, and Yuspa SH.** Two oncogenes, v-fos and v-ras, cooperate to convert normal keratinocytes to squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 643-647, 1990.
106. **Grigorescu AC, Draghici IN, Nitipir C, Gutulescu N, and Corlan E.** Gemcitabine (GEM) and carboplatin (CBDCA) versus cisplatin (CDDP) and vinblastine (VLB) in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) stages III and IV: a phase III randomised trial. *Lung Cancer* 37: 9-14, 2002.
107. **Gu H, Zou YR, and Rajewsky K.** Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155-1164, 1993.
108. **Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V, and Barbacid M.** Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4: 111-120, 2003.
109. **Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, and Davis RJ.** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15: 2760-2770, 1996.
110. **Haagensohn KK, and Wu GS.** The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 29: 143-149, 2010.
111. **Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, Blumenberg M, Bowcock AM, Krueger JG, and Carucci JA.** Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol* 126: 869-881, 2006.
112. **Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811, 1994.
113. **Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, and Ulevitch RJ.** Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271: 2886-2891, 1996.
114. **Han J, and Sun P.** The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32: 364-371, 2007.
115. **Hanahan D, and Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.

116. **Hanahan D, and Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
117. **Hayden MS, and Ghosh S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224, 2004.
118. **Hennings H, Shores R, Mitchell P, Spangler EF, and Yuspa SH.** Induction of papillomas with a high probability of conversion to malignancy. *Carcinogenesis* 6: 1607-1610, 1985.
119. **Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R, and Yuspa SH.** Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 304: 67-69, 1983.
120. **Herman JG, and Baylin SB.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054, 2003.
121. **Hettinga J, Konings A, and Kampinga H.** Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia—a review. *International journal of hyperthermia* 13: 439-457, 1997.
122. **Hirst GL, and Balmain A.** Forty years of cancer modelling in the mouse. *Eur J Cancer* 40: 1974-1980, 2004.
123. **Holladay K, Fujiki H, and Bowden GT.** Okadaic acid induces the expression of both early and secondary response genes in mouse keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis* 5: 16-24, 1992.
124. **Holland PM, Suzanne M, Campbell JS, Noselli S, and Cooper JA.** MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase functionally related to hemipterous. *J Biol Chem* 272: 24994-24998, 1997.
125. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
126. **Iannaccone PM, Weinberg WC, and Deamant FD.** On the clonal origin of tumors: a review of experimental models. *Int J Cancer* 39: 778-784, 1987.
127. **Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, Machado-Pinilla R, Rodriguez-Fanjul V, Manguan-Garcia C, Cejas P, Lopez-Rios F, Paz-Ares L, de CastroCarpeno J, Nistal M, Belda-Iniesta C, and Perona R.** IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 29: 1681-1690, 2010.
128. **Imamoto A, Beltran LM, and DiGiovanni J.** Evidence for autocrine/paracrine growth stimulation by transforming growth factor-alpha during the process of skin tumor promotion. *Mol Carcinog* 4: 52-60, 1991.
129. **Ise K, Nakamura K, Nakao K, Shimizu S, Harada H, Ichise T, Miyoshi J, Gondo Y, Ishikawa T, and Aiba A.** Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 19: 2951-2956, 2000.
130. **Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, and Tuveson DA.** Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15: 3243-3248, 2001.
131. **Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, and Han J.** Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271: 17920-17926, 1996.
132. **Johnson GL, and Nakamura K.** The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1341-1348, 2007.
133. **Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, and Jacks T.** K-ras is an

- essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11: 2468-2481, 1997.
134. **Johnson P, and Kim E.** Update on approaches to the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Oncology Special Edition* 8: 133-137, 2005.
 135. **Jonkers J, and Berns A.** Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 251-265, 2002.
 136. **Karin M, and Lin A.** NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227, 2002.
 137. **Kataoka K, Kim DJ, Carbajal S, Clifford JL, and DiGiovanni J.** Stage-specific disruption of Stat3 demonstrates a direct requirement during both the initiation and promotion stages of mouse skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29: 1108, 2008.
 138. **Kaur J, Sharma M, Sharma P, and Bansal M.** Antitumor Activity of Lantadenes in DMBA/TPA Induced Skin Tumors in Mice: Expression of Transcription Factors. *Am J Biomed Sci* 2: 79-90, 2010.
 139. **Ke H, Harris R, Coloff JL, Jin JY, Leshin B, Miliani de Marval P, Tao S, Rathmell JC, Hall RP, and Zhang JY.** The c-Jun NH2-terminal kinase 2 plays a dominant role in human epidermal neoplasia. *Cancer Res* 70: 3080-3088, 2010.
 140. **Kelland L.** The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 573-584, 2007.
 141. **Kemp CJ.** Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 15: 460-473, 2005.
 142. **Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A, and Balmain A.** Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell* 74: 813-822, 1993.
 143. **Keshet Y, and Seger R.** The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661: 3-38, 2010.
 144. **Keyse SM.** Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27: 253-261, 2008.
 145. **Keyse SM.** Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12: 186-192, 2000.
 146. **Keyse SM, and Ginsburg M.** Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and cdc25. *Trends Biochem Sci* 18: 377-378, 1993.
 147. **Khosravi-Far R, and Der CJ.** The Ras signal transduction pathway. *Cancer and Metastasis Reviews* 13: 67-89, 1994.
 148. **Khosravi-Far R, Soltski PA, Clark GJ, Kinch MS, and Der CJ.** Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Molecular and cellular biology* 15: 6443, 1995.
 149. **Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, and Jacks T.** Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823-835, 2005.
 150. **Kim DJ, Chan KS, Sano S, and DiGiovanni J.** Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* 46: 725-731, 2007.
 151. **Kim SD, Moon CK, Eun SY, Ryu PD, and Jo SA.** Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 326-334, 2005.

152. **Kinney CM, Chandrasekharan UM, Yang L, Shen J, Kinter M, McDermott MS, and DiCorleto PE.** Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C242-249, 2009.
153. **Klein-Szanto AJ, Larcher F, Bonfil RD, and Conti CJ.** Multistage chemical carcinogenesis protocols produce spindle cell carcinomas of the mouse skin. *Carcinogenesis* 10: 2169-2172, 1989.
154. **Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, and Katsuki M.** K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15: 1151-1159, 1997.
155. **Kohno M, and Pouyssegur J.** Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 38: 200-211, 2006.
156. **Kondoh K, and Nishida E.** Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1227-1237, 2007.
157. **Koster MI, and Roop DR.** Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 93-113, 2007.
158. **Kress S, Sutter C, Strickland PT, Mukhtar H, Schweizer J, and Schwarz M.** Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res* 52: 6400-6403, 1992.
159. **Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, and Rajewsky K.** Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429, 1995.
160. **Kumagai Y, Zhang Y, Kim OJ, and Miller CA.** Human c-Jun N-terminal kinase expression and activation in the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 10-17, 1999.
161. **Kundu S, Fan K, Cao M, Lindner DJ, Tuthill R, Liu L, Gerson S, Borden E, and Yi T.** Tyrosine phosphatase inhibitor-3 sensitizes melanoma and colon cancer to biotherapeutics and chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 9: 2287-2296, 2010.
162. **Kyriakis JM, and Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
163. **Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, and Woodgett JR.** The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-160, 1994.
164. **Lebwohl D, and Canetta R.** Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34: 1522-1534, 1998.
165. **Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, and et al.** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-746, 1994.
166. **Lee JD, Ulevitch RJ, and Han J.** Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 715-724, 1995.
167. **Li F, Meng L, Zhou J, Xing H, Wang S, Xu G, Zhu H, Wang B, Chen G, Lu YP, and Ma D.** Reversing chemoresistance in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells: a role of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 1070-1077, 2005.
168. **Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, and Liu Y.** Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol* 21: 8213-8224, 2001.
169. **Li N, Batt D, and Warmuth M.** B-Raf kinase inhibitors for cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs* 8: 452-456, 2007.

170. **Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, and Han J.** The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 334-340, 1996.
171. **Liao Q, Guo J, Kleeff J, Zimmermann A, Buchler MW, Korc M, and Friess H.** Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 124: 1830-1845, 2003.
172. **Lim EH, Aggarwal A, Agasthian T, Wong PS, Tan C, Sim E, Tan L, Goh PS, Wang SC, and Khoo KL.** Feasibility of using low-volume tissue samples for gene expression profiling of advanced non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research* 9: 5980, 2003.
173. **Livak KJ, and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
174. **Loda M, Capodieci P, Mishra R, Yao H, Corless C, Grigioni W, Wang Y, Magi-Galluzzi C, and Stork PJ.** Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 149: 1553-1564, 1996.
175. **Loehrke H, Schweizer J, Dederer E, Hesse B, Rosenkranz G, and Goerttler K.** On the persistence of tumor initiation in two-stage carcinogenesis on mouse skin. *Carcinogenesis* 4: 771-775, 1983.
176. **Loesch M, and Chen G.** The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Front Biosci* 13: 3581-3593, 2008.
177. **Lomonaco SL, Kahana S, Blass M, Brody Y, Okhrimenko H, Xiang C, Finniss S, Blumberg PM, Lee HK, and Brodie C.** Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues induces sustained activation of Erk1/2 via down-regulation of MKP-1: role in the apoptotic effect of etoposide. *J Biol Chem* 283: 17731-17739, 2008.
178. **Longley DB, and Johnston PG.** Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205: 275-292, 2005.
179. **Losa JH, Parada Cobo C, Viniegra JG, Sanchez-Arevalo Lobo VJ, Ramon y Cajal S, and Sanchez-Prieto R.** Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* 22: 3998-4006, 2003.
180. **Lucci MA, Orlandi R, Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, and Villa-Moruzzi E.** Expression profile of tyrosine phosphatases in HER2 breast cancer cells and tumors. *Cell Oncol* 32: 361-372, 2010.
181. **Luo J, Kamata H, and Karin M.** IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Investigation* 115: 2625, 2005.
182. **Magi-Galluzzi C, Montironi R, Cangi MG, Wishnow K, and Loda M.** Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch* 432: 407-413, 1998.
183. **Mandel JS, and Oken M.** Etiology, prevention, and treatment of breast, prostate, colorectal, and lung cancer. *Minn Med* 81: 44-46, 71, 1998.
184. **Manzano RG, Montuenga LM, Dayton M, Dent P, Kinoshita I, Vicent S, Gardner GJ, Nguyen P, Choi YH, Trepel J, Auersperg N, and Birrer MJ.** CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene* 21: 4435-4447, 2002.
185. **Marks JG, and Miller JJ.** *Lookingbill and Marks' principles of dermatology.* Saunders Elsevier, 2006.

186. **Marmor MD, Skaria KB, and Yarden Y.** Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 903-913, 2004.
187. **Martin LP, Hamilton TC, and Schilder RJ.** Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14: 1291-1295, 2008.
188. **Martínez-Cruz AB, Santos M, Lara MF, Segrelles C, Ruiz S, Moral M, Lorz C, García-Escudero R, and Paramio JM.** Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors. *Cancer research* 68: 683, 2008.
189. **Masiero M, Minuzzo S, Pusceddu I, Moserle L, Persano L, Agnusdei V, Tosello V, Basso G, Amadori A, and Indraccolo S.** Notch3-mediated regulation of MKP-1 levels promotes survival of T acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 25: 588-598, 2011.
190. **Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, and Ichijo H.** ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nature immunology* 6: 587-592, 2005.
191. **McCubrey JA, Milella M, Tafuri A, Martelli AM, Lunghi P, Bonati A, Cervello M, Lee JT, and Steelman LS.** Targeting the Raf/MEK/ERK pathway with small-molecule inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 614-630, 2008.
192. **Mebratu Y, and Tesfagzi Y.** How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8: 1168-1175, 2009.
193. **Mertens S, Craxton M, and Goedert M.** SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 383: 273-276, 1996.
194. **Meuwissen R, Jonkers J, and Berns A.** Mouse models for sporadic cancer. *Exp Cell Res* 264: 100-110, 2001.
195. **Meuwissen R, Linn SC, van der Valk M, Mooi WJ, and Berns A.** Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene. *Oncogene* 20: 6551-6558, 2001.
196. **Mijatovic T, Op De Beeck A, Van Quaquebeke E, Dewelle J, Darro F, de Launoit Y, and Kiss R (2006).** The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5: 391-399.
197. **Mirmohammadsadegh A, Mota R, Gustrau A, Hassan M, Nambiar S, Marini A, Bojar H, Tannapfel A, and Hengge UR.** ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis. *Journal of investigative dermatology* 127: 2207-2215, 2007.
198. **Mitsuuchi Y, and Testa JR.** Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *American journal of medical genetics* 115: 183-188, 2002.
199. **Molina JR, Adjei AA, and Jett JR.** Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Chest* 130: 1211-1219, 2006.
200. **Mommers JM, van Rossum MM, van Erp PE, and van De Kerkhof PC.** Changes in keratin 6 and keratin 10 (co-)expression in lesional and symptomless skin of spreading psoriasis. *Dermatology* 201: 15-20, 2000.
201. **Moncho-Amor V, de C, II, Bandres E, Martinez-Poveda B, Orgaz JL, Sanchez-Perez I, Zazo S, Rovira A, Albanell J, Jimenez B, Rojo F, Belda-Iniesta C, Garcia-Foncillas J, and Perona R.** DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 30: 668-678, 2011.
202. **Morrison DK, and Davis RJ.** Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118, 2003.

203. **Moynagh PN.** The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 118: 4589-4592, 2005.
204. **Muller PA, Vousden KH, and Norman JC.** p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol* 192: 209-218, 2011.
205. **Murphy LO, and Blenis J.** MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31: 268-275, 2006.
206. **Murty VV, Reuter VE, Bosl GJ, and Chaganti RS.** Deletion mapping identifies loss of heterozygosity at 5p15.1-15.2, 5q11 and 5q34-35 in human male germ cell tumors. *Oncogene* 12: 2719-2723, 1996.
207. **Naor Z, Benard O, and Seger R.** Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11: 91-99, 2000.
208. **Nelson MA, Futscher BW, Kinsella T, Wymer J, and Bowden GT.** Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6398, 1992.
209. **New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, and Han J.** PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* 17: 3372-3384, 1998.
210. **Ni H, Wang XS, Diener K, and Yao Z.** MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 492-496, 1998.
211. **Nishizuka Y.** Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312, 1986.
212. **O'Connell JF, Klein-Szanto AJ, DiGiovanni DM, Fries JW, and Slaga TJ.** Enhanced malignant progression of mouse skin tumors by the free-radical generator benzoyl peroxide. *Cancer Res* 46: 2863-2865, 1986.
213. **Ornstein DL, Nervi AM, and Rigas JR.** Docetaxel (Taxotere) in combination chemotherapy and in association with thoracic radiotherapy for the treatment of non-small-cell lung cancer. Thoracic Oncology Program. *Ann Oncol* 10 Suppl 5: S35-40, 1999.
214. **Owens DM, and Keyse SM.** Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26: 3203-3213, 2007.
215. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, and Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
216. **Pedrazzini L, Leitch A, and Bromberg J.** Stat3 is required for the development of skin cancer. *Journal of Clinical Investigation* 114: 619-622, 2004.
217. **Peixin D, Zhujie X, Nan J, Dajin L, and Youji F.** Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway. *Molecular Cancer* 8.
218. **Peng HQ, Liu L, Goss PE, Bailey D, and Hogg D.** Chromosomal deletions occur in restricted regions of 5q in testicular germ cell cancer. *Oncogene* 18: 3277-3283, 1999.
219. **Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, and Lacal JC.** Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 11: 463-475, 1997.
220. **Perona R, and Sanchez-Perez I.** Signalling pathways involved in clinical responses to chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 9: 625-633, 2007.
221. **Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, and Pelling JC.** Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of

extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5: 1007-1014, 1999.

222. **Pittelkow MR, Coffey RJ, Jr., and Moses HJ.** Keratinocytes produce and are regulated by transforming growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 548: 211-224, 1988.

223. **Plattner R, Gupta S, Khosravi-Far R, Sato KY, Perucho M, Der CJ, and Stanbridge EJ.** Differential contribution of the ERK and JNK mitogen-activated protein kinase cascades to Ras transformation of HT1080 fibrosarcoma and DLD-1 colon carcinoma cells. *Oncogene* 18: 1807-1814, 1999.

224. **Pruitt K, Pruitt WM, Bilter GK, Westwick JK, and Der CJ.** Raf-independent deregulation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases are critical for Ras transformation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 31808, 2002.

225. **Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaría D, and Barbacid M.** A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 18: 63, 2010.

226. **Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, and Balmain A.** Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322: 78-80, 1986.

227. **Rabik CA, and Dolan ME.** Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33: 9-23, 2007.

228. **Rane SG.** Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33: 107-127, 1999.

229. **Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TL, and Visakorpi T.** Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *Int J Cancer* 117: 738-745, 2005.

230. **Redmond KM, Wilson TR, Johnston PG, and Longley DB.** Resistance mechanisms to cancer chemotherapy. *Front Biosci* 13: 5138-5154, 2008.

231. **Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C, and Slamon DJ.** Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 8: 1913-1919, 1993.

232. **Renouf DJ, Wood-Baker R, Ionescu DN, Leung S, Masoudi H, Gilks CB, and Laskin J.** BCL-2 expression is prognostic for improved survival in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 4: 486-491, 2009.

233. **Rho JK, Choi YJ, Ryoo BY, Na, II, Yang SH, Kim CH, and Lee JC.** p53 enhances gefitinib-induced growth inhibition and apoptosis by regulation of Fas in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 67: 1163-1169, 2007.

234. **Riely GJ, Marks J, and Pao W.** KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6: 201-205, 2009.

235. **Robbins D, Gu X, Shi R, Liu J, Wang F, Ponville J, McCord JM, and Zhao Y.** The chemopreventive effects of Protandim: modulation of p53 mitochondrial translocation and apoptosis during skin carcinogenesis. *PLoS One* 5: e11902, 2010.

236. **Roberts PJ, and Der CJ.** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310, 2007.

237. **Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R, Dalmases A, Menendez S, Cortes-Sempere M, Suarez C, Oliva C, Servitja S, Rodriguez-Fanjul V, Sanchez-Perez I, Campas C, Corominas JM, Tusquets I, Bellosillo B, Serrano S, Perona R, Rovira A, and Albanell J.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human

- breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* 15: 3530-3539, 2009.
238. **Rose-John S, Furstenberger G, Krieg P, Besemfelder E, Rincke G, and Marks F.** Differential effects of phorbol esters on c-fos and c-myc and ornithine decarboxylase gene expression in mouse skin in vivo. *Carcinogenesis* 9: 831-835, 1988.
239. **Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, and Nebreda AR.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78: 1027-1037, 1994.
240. **Roux PP, and Blenis J.** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344, 2004.
241. **Sakaue H, Ogawa W, Nakamura T, Mori T, Nakamura K, and Kasuga M.** Role of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 39951-39957, 2004.
242. **Sanchez-Perez I, Benitah SA, Martinez-Gomariz M, Lacal JC, and Perona R.** Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NFkappaB activity and cell viability. *Mol Biol Cell* 13: 2933-2945, 2002.
243. **Sanchez-Perez I, and Perona R.** Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Lett* 453: 151-158, 1999.
244. **Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, and Zon LI.** Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372: 794-798, 1994.
245. **Sano S, Chan KS, Kira M, Kataoka K, Takagi S, Tarutani M, Itami S, Kiguchi K, Yokoi M, and Sugawara K.** Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer research* 65: 5720, 2005.
246. **Sargent LM, Senft JR, Lowry DT, Jefferson AM, Tyson FL, Malkinson AM, Coleman AE, and Reynolds SH.** Specific chromosomal aberrations in mouse lung adenocarcinoma cell lines detected by spectral karyotyping: a comparison with human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 62: 1152-1157, 2002.
247. **Saxena M, and Mustelin T.** Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* 12: 387-396, 2000.
248. **Scribner JD, Scribner NK, McKnight B, and Mottet NK.** Evidence for a new model of tumor progression from carcinogenesis and tumor promotion studies with 7-bromomethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res* 43: 2034-2041, 1983.
249. **Schindler EM, Hinds A, Gribben EL, Burns CJ, Yin Y, Lin MH, Owen RJ, Longmore GD, Kissling GE, Arthur JS, and Efimova T.** p38delta Mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. *Cancer Res* 69: 4648-4655, 2009.
250. **Schmidt M, Goebeler M, Posern G, Feller SM, Seitz CS, Bröcker EB, Rapp UR, and Ludwig S.** Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 41011, 2000.
251. **Schmitz ML, dos Santos Silva MA, and Baeuerle PA.** Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 270: 15576-15584, 1995.
252. **Schmuth M, Fluhr JW, Crumrine DC, Uchida Y, Hachem JP, Behne M, Moskowicz DG, Christiano AM, Feingold KR, and Elias PM.** Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma

- (Vohwinkel syndrome with ichthyosis). *Journal of investigative dermatology* 122: 909-922, 2004.
253. **Sergew A, Liu Y, Powers J, Keith R, Redente E, and Riches D.** MAPK Phosphatases-1 In Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181: A3537, 2010.
254. **Seve P, and Dumontet C.** Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 73-88, 2005.
255. **She QB, Chen N, Bode AM, Flavell RA, and Dong Z.** Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 62: 1343-1348, 2002.
256. **Siddiquee KAZ, and Turkson J.** STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell research* 18: 254-267, 2008.
257. **Singh S, Upadhyay AK, Ajay AK, and Bhat MK.** p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett* 581: 289-295, 2007.
258. **Sloan KA, Marquez HA, Li J, Cao Y, Hinds A, O'Hara CJ, Kathuria S, Ramirez MI, Williams MC, and Kathuria H.** Increased PEA3/E1AF and decreased Net/Elk-3, both ETS proteins, characterize human NSCLC progression and regulate caveolin-1 transcription in Calu-1 and NCI-H23 NSCLC cell lines. *Carcinogenesis* 30: 1433-1442, 2009.
259. **Small GW, Shi YY, Higgins LS, and Orlowski RZ.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* 67: 4459-4466, 2007.
260. **Song JJ, and Lee YJ.** Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *J Biol Chem* 278: 47245-47252, 2003.
261. **Steelman L, Pohnert S, Shelton J, Franklin R, Bertrand F, and McCubrey J.** JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18: 189-218, 2004.
262. **Stenback F.** Characteristics of neoplastic progression and tumor behavior in skin carcinogenesis by different methods: an experimental study. *Oncology* 37: 163-168, 1980.
263. **Stewart DJ, Chiritescu G, Dahrouge S, Banerjee S, and Tomiak EM.** Chemotherapy dose--response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms. *Cancer Treat Rev* 33: 101-137, 2007.
264. **Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, and Maller JL.** Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334: 715-718, 1988.
265. **Suzuki M, Shigematsu H, Hiroshima K, Iizasa T, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, and Fujisawa T.** Epidermal growth factor receptor expression status in lung cancer correlates with its mutation. *Hum Pathol* 36: 1127-1134, 2005.
266. **Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, and Van Dyke T.** p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78: 703-711, 1994.
267. **Tang JM, He QY, Guo RX, and Chang XJ.** Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 51: 181-191, 2006.
268. **Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, and Kikuchi K.** Small cell lung cancer cells express EGFR and tyrosine phosphorylation of EGFR is inhibited by gefitinib ("Iressa", ZD1839). *Oncol Rep* 12: 1053-1057, 2004.

269. **Tapia MA, Gonzalez-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodriguez-Fanjul V, Rolfe M, Ross JS, Mezquita J, Mezquita C, Bachs O, Gascon P, Rojo F, Perona R, Rovira A, and Albanell J.** Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle* 6: 2284-2292, 2007.
270. **Tarrega C, Nunes-Xavier C, Cejudo-Marin R, Martin-Perez J, and Pulido R.** Studying the regulation of MAP Kinase by MAP Kinase phosphatases in vitro and in cell systems. *Methods Mol Biol* 661: 305-321, 2010.
271. **Tennenbaum T, Weiner AK, Belanger AJ, Glick AB, Hennings H, and Yuspa SH.** The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 53: 4803-4810, 1993.
272. **Tennenbaum T, Yuspa SH, Grover A, Castronovo V, Sobel ME, Yamada Y, and De Luca LM.** Extracellular matrix receptors and mouse skin carcinogenesis: altered expression linked to appearance of early markers of tumor progression. *Cancer Res* 52: 2966-2976, 1992.
273. **Theodosiou A, and Ashworth A.** MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* 3: REVIEWS3009, 2002.
274. **Thompson N, and Lyons J.** Recent progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 5: 350-356, 2005.
275. **Thornton TM, and Rincon M.** Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5: 44-51, 2009.
276. **Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, and Nishida E.** Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem* 136: 557-561, 2004.
277. **Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, and Nishida E.** ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97: 697-702, 2006.
278. **Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, and Davis RJ.** Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7337-7342, 1997.
279. **Toyooka S, Tsuda T, and Gazdar AF.** The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat* 21: 229-239, 2003.
280. **Toyoshima F, Moriguchi T, and Nishida E.** Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J Cell Biol* 139: 1005-1015, 1997.
281. **Travis WD.** Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 23: 65-81, viii, 2002.
282. **Tsujita E, Taketomi A, Gion T, Kuroda Y, Endo K, Watanabe A, Nakashima H, Aishima S, Kohnoe S, and Maehara Y.** Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 69: 342-347, 2005.
283. **Upadhyay AK, Ajay AK, Singh S, and Bhat MK.** Cell Cycle Regulatory Protein 5 (Cdk5) is a Novel Downstream Target of ERK in Carboplatin Induced Death of Breast Cancer Cells (Supplementary Data). *Current cancer drug targets* 8: 741-752, 2008.
284. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034, 2002.
285. **Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, Pasparakis M, and Nebreda AR.** p38 MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature genetics* 39: 750-758, 2007.

286. **Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM, Lozano MD, Toledo G, Thunnissen FB, Manzano RG, and Montuenga LM.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res* 10: 3639-3649, 2004.
287. **Vicent S, Garayoa M, López-Picazo JM, Lozano MD, Toledo G, Thunnissen FBJM, Manzano RG, and Montuenga LM.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clinical cancer research* 10: 3639, 2004.
288. **Wagner EF, and Nebreda AR.** Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549, 2009.
289. **Wang HY, Cheng Z, and Malbon CC.** Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett* 191: 229-237, 2003.
290. **Wang J, Zhou JY, and Wu GS.** ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67: 11933-11941, 2007.
291. **Wang X, Destrument A, and Tournier C.** Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1349-1357, 2007.
292. **Wang X, Martindale JL, and Holbrook NJ.** Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: 39435-39443, 2000.
293. **Wang Z, Xu J, Zhou JY, Liu Y, and Wu GS.** Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res* 66: 8870-8877, 2006.
294. **Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, and Cooper JA.** Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16: 1909-1920, 1997.
295. **Wei SQ, Sui LH, Zheng JH, Zhang GM, and Kao YL.** Role of ERK1/2 kinase in cisplatin-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Chin Med Sci J* 19: 125-129, 2004.
296. **Weston CR, and Davis RJ.** The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19: 142-149, 2007.
297. **Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, and Holtmann H.** The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18: 4969-4980, 1999.
298. **Wu GS.** Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26: 579-585, 2007.
299. **Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, and Templeton DJ.** Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372: 798-800, 1994.
300. **Yoon S, and Seger R.** The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24: 21-44, 2006.
301. **Yoshino I, Osoegawa A, Yohena T, Kameyama T, Oki E, Oda S, and Maehara Y.** Loss of heterozygosity (LOH) in non-small cell lung cancer: difference between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Respir Med* 99: 308-312, 2005.
302. **Yuan Z, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, and Cheng JQ.** AKT2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23432, 2003.
303. **Yuspa SH.** The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J Dermatol Sci* 17: 1-7, 1998.

304. **Yuspa SH.** The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 54: 1178-1189, 1994.
305. **Yuspa SH, Ben T, Hennings H, and Lichti U.** Divergent responses in epidermal basal cells exposed to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 42: 2344-2349, 1982.
306. **Yuspa SH, Kilkenny A, Cheng C, Roop D, Hennings H, Kruszewski F, Lee E, Strickland J, and Greenhalgh DA.** Alterations in epidermal biochemistry as a consequence of stage-specific genetic changes in skin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 93: 3, 1991.
307. **Zalaudek I, Kreusch J, Giacomel J, Ferrara G, Catrical C, and Argenziano G.** How to diagnose nonpigmented skin tumors: A review of vascular structures seen with dermoscopy:: Part II. Nonmelanocytic skin tumors. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63: 377-386, 2010.
308. **Zhang JY, Adams AE, Ridky TW, Tao S, and Khavari PA.** Tumor necrosis factor receptor 1/c-Jun-NH2-kinase signaling promotes human neoplasia. *Cancer Res* 67: 3827-3834, 2007.
309. **Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, and Kinzler KW.** Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272, 1997.
310. **Zhang X, Makino T, Muchemwa FC, Lin T, Wakasugi S, Egawa K, and Ihn H.** Activation of the extracellular signal-regulated kinases signaling pathway in squamous cell carcinoma of the skin. *Biosci Trends* 1: 156-160, 2007.
311. **Zheng CF, and Guan KL.** Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 268: 23933-23939, 1993.
312. **Zhou G, Bao ZQ, and Dixon JE.** Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270: 12665-12669, 1995.
313. **Zhou X, Ferraris JD, Dmitrieva NI, Liu Y, and Burg MB.** MKP-1 inhibits high NaCl-induced activation of p38 but does not inhibit the activation of TonEBP/OREBP: opposite roles of p38alpha and p38delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5620-5625, 2008.
314. **Zinkel S, and Fuchs E.** Skin cancer and transgenic mice. *Semin Cancer Biol* 5: 77-90, 1994.
315. **Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, and Minna JD.** Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 64: 681-708, 2002.
316. **Zoumpourlis V, Solakidi S, Papathoma A, and Papaevangelidou D.** Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24: 1159-1165, 2003.

Anexos

Anexo I:

Eventos de difusión científica

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-21).

Oslo, Norway. 26-29 Junio 2010.

Presentación poster. "Role of MKP1 in skin carcinogenesis".

V. Rodríguez-Fanjul, S. Zazo, I. Sánchez-Pérez, F. Rojo, R. Perona

XII National Meeting of Medicine Oncology of the Spanish Society of Medicine Oncology (SEOM). Barcelona, Spain. 21-23 October 2009.

Poster presentation. "Análisis mediante análisis seriado de expression génica (SAGE) del transcriptoma implicado en la respuesta a cisplatino en el carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP)".

XII National Meeting of Medicine Oncology of the Spanish Society of Medicine Oncology (SEOM). Barcelona, Spain. 21-23 October 2009.

Poster presentation. "La metilación aberrante del promotor de IGFBP3 se relaciona con la resistencia a cisplatino en el carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP)".

XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA)

Madrid, España. 6-8 Mayo 2009.

Presentación poster: "Role of MKP1 in skin carcinogenesis".

V. Rodríguez-Fanjul, I. Sánchez-Pérez, S.Zazo, F. Rojo, R. Perona.

Clinical & Translational Oncology, Vol. 11 (Extraordinary 1), May 2009.

XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA)

Madrid, España. 6-8 Mayo 2009.

Presentación poster: "Identification of DNA methylation markers as novel predictors and targets for the therapeutic response to cisplatin in NSCLC".

I.Ibanez de Cáceres, M. Cortes, C. Moratilla, R. Machado-Pinilla, **V. Rodríguez-Fanjul**, C. Manguan, J. Castro, M. Nistal, C. Belda, R. Perona.

Clinical & Translational Oncology, Vol. 11 (Extraordinary 1), May 2009.

20th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR).

Lyon, Francia. 5-8 Julio 2008.

Presentación poster. "MKP1 regulates susceptibility to genotoxic stress".

V. Rodríguez-Fanjul, I. Sánchez-Pérez, R. Perona

European Journal of Cancer, Vol. 6, No. 9, July 2008.

20th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR).

Lyon, Francia. 5-8 Julio 2008.

Presentación poster: "Identification of drug-sensitive prediction genes by an epigenetic reactivation screen of cisplatin-resistant NSCLC cell lines".

I.Ibanez de Cáceres, C. Moratilla, M. Cortes Sempere, R. Machado-Pinilla, **V. Rodríguez-Fanjul**, C. Manguan, J. de Castro Carpeño, C. Belda-Iniesta C, P. Cejas, R. Perona.

European Journal of Cancer, Vol. 6, No. 9, July 2008.

12th World Conference on Lung Cancer. International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)

Seoul, Korea. 2-6 Septiembre 2007

Comunicación oral: "Global expression profile in NSCLC surgical samples predicts response to Pemetrexed".

Perona R, de Castro J, Machado-Pinilla. R, Belda-Iniesta C, **Rodríguez-Fanjul V**, Ibanez de Cáceres, Casado E, Cejas P, Sanchez-Garcia J, Nistal M, Gonzalez-Baron M.

X Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA)

Pamplona, España. 13-16 Octubre 2005.

Presentación póster: "Rutas de transducción de señales activadas por Carboplatino en células de carcinoma no microcítico de pulmón".

V. Rodríguez Fanjul, L.M. Ruiz Godoy, J. de Castro, C. Belda Iniesta, E. Casado, M. Gonzalez Baron, R. Perona.

6th Transgenic Technology Meeting TT2005

Barcelona, España. 11-13 Septiembre 2005.

V CONGRESO NACIONAL de la Federación Española de Sociedades Oncológicas (FESEO)

Valencia, España. 17-19 Noviembre 2004.

PARTICIPACIÓN EN SEMINARIOS, CURSOS Y EVENTOS DE DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Curso "Análisis de datos de expresión génica con R"

Biomol-Informatics SL. Madrid, 22-25 Junio 2009.

Curso "Cáncer: Genes, Mecanismos y Procesos"

Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Madrid, 5-22 febrero 2007.

Curso de Capacitación de Operadores de Instalaciones radiactivas. Campo de aplicación: **Laboratorio con fuentes no encapsuladas.**

Servicio de Protección Radiológica. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols". Madrid, 22 enero-2 febrero 2007

Homologado por el Consejo de Seguridad Nuclear.

Curso "Transducción de señales"

Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Madrid, 31octubre-21 diciembre 2006.

Curso "Modificación Genética en Mamíferos"

Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols" (IIB), Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Madrid, 6-24 de Febrero 2006.

Course on basic transgenic techniques.

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Barcelona, España. 11-13 Septiembre 2005.

Gene Signatures Symposia

Applied Biosystems. Madrid, 9 Marzo 2005

Curso/ Conferencia CÁNCER DE PULMÓN

European School of Oncology (ESO) y Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIO). Madrid, 17-18 Febrero 2005

Curso Básico de Radiactividad.

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols". Madrid, febrero 2003.

Anexo II: *Publicaciones*

ORIGINAL ARTICLE

***IGFBP-3* hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer**

I Ibanez de Caceres¹, M Cortes-Sempere², C Moratilla², R Machado-Pinilla², V Rodriguez-Fanjul², C Manguán-García², P Cejas³, F López-Ríos^{4,7}, L Paz-Ares^{5,8}, J de CastroCarpeño³, M Nistal⁶, C Belda-Iniesta³ and R Perona²

¹Oncology Research Laboratory, Research Unit, FIB-La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ²Instituto de Investigaciones Biomedicas CSIC/UAM, Translational Oncology Unit CSIC/H La Paz, Madrid, Spain; ³Department of Medical Oncology, La Paz University Hospital, Translational Oncology Unit CSIC/H La Paz, Madrid, Spain; ⁴Department of Pathology, 12 de Octubre Hospital, Madrid, Spain; ⁵Department of Medical Oncology, 12 de Octubre Hospital, Madrid, Spain and ⁶Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

Cisplatin-based chemotherapy is the paradigm of non-small-cell lung cancer (NSCLC) treatment; however, it also induces *de novo* DNA-hypermethylation, a process that may be involved in the development of drug-resistant phenotypes by inactivating genes required for drug-cytotoxicity. By using an expression microarray analysis, we aimed to identify those genes reactivated in a set of two cisplatin (CDDP) resistant and sensitive NSCLC cell lines after epigenetic treatment. Gene expression, promoter methylation and CDDP-chemoresponse were further analyzed in three matched sets of sensitive/resistant cell lines, 23 human cancer cell lines and 36 NSCLC specimens. Results revealed specific silencing by promoter hypermethylation of *IGFBP-3* in CDDP resistant cells, whereas *IGFBP-3* siRNA interference, induced resistance to CDDP in sensitive cells ($P < 0.001$). In addition, we found a strong correlation between methylation status and CDDP response in tumor specimens ($P < 0.001$). Thus, stage I patients, whose tumors harbor an unmethylated promoter, had a trend towards increased disease-free survival (DFS). We report that a loss of *IGFBP-3* expression, mediated by promoter-hypermethylation, results in a reduction of tumor cell sensitivity to cisplatin in NSCLC. Basal methylation status of *IGFBP-3* before treatment may be a clinical biomarker and a predictor of the chemotherapy outcome, helping to identify patients who are most likely to benefit from CDDP therapy alone or in combination with epigenetic treatment.

Oncogene (2010) 29, 1681–1690; doi:10.1038/onc.2009.454; published online 21 December 2009

Keywords: CDDP-resistance; *IGFBP-3*; NSCLC; hypermethylation

Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) comprises more than 80% of lung cancers, with 1.2 million new cases worldwide each year (WCR, 2003; Jemal *et al.*, 2008). Cisplatin (CDDP)-based chemotherapy remains the standard treatment in combination with other chemotherapeutic agents; however, NSCLC patients frequently exhibit chemotherapy resistance. Molecular mechanisms of drug resistance remain unclear and are believed to be multifactorial, involving host factors, numerous molecular events and genetic and epigenetic changes (Gottesman, 2002). In addition, chemotherapeutics induce epigenetic changes in the promoter area of specific genes, altering expression and possibly underlying resistance in many tumor types (Baker *et al.*, 2005).

The aberrant DNA hypermethylation of CpG islands in the gene promoter region is well-described as an alternative mechanism for tumor suppressor genes silencing in cancer cells. This includes lung cancer cells, in which MGMT, p16, RARb, TIMP-3 and DAPK have been reported as hypermethylated (Merlo *et al.*, 1995; Esteller *et al.*, 1999; Zochbauer-Muller *et al.*, 2001). In addition, drug-induced DNA hypermethylation could be a mechanism of tumor cell response to chemotherapy agents (Nyce, 1997; Strathdee *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). In both lung adenocarcinoma (HTB-54) and rhabdomyosarcoma human cells (CCl-136), pulse exposure to CDDP is associated with drug-induced DNA hypermethylation (Nyce, 1989), an event that has also been reported *in vivo* (Koul *et al.*, 2004). Therefore, one possible reason for the development of chemoresistance in NSCLC might be the epigenetic inactivation of certain tumor suppressor gene as a consequence of chemotherapy treatment. This epigenetic silencing could be reverted by demethylating drugs and histone deacetylase inhibitors such as 5 Aza-2deoxycytidine (5Aza-dC) and Trichostatine A (TSA). Both drugs act in synergy by depleting methyltransferase activity (Baylin *et al.*, 1998) and reversing the formation of transcriptionally repressive chromatin structure (Marks *et al.*, 2004). Thus, the association between promoter-demethylation of *hMLH1* by

Correspondence: Dr I Ibanez de Caceres, Oncology Research Laboratory, FIB-La Paz University Hospital, Instituto de Investigaciones Biomedicas Madrid, C/Arturo Duperier, 4, Madrid, 28029, Spain. E-mail: inma.ibanezca@salud.madrid.org

⁷Current address: Department of Pathology, H Clara Campal, Madrid, Spain

⁸Current address: Department of Medical Oncology, H. V. del Rocio, Sevilla, Spain

Received 6 June 2009; revised 27 July 2009; accepted 8 November 2009; published online 21 December 2009

pharmacological treatment and reversal of drug-resistance has been reported in human tumor xenografts (Plumb *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 2009).

Many epigenetically silenced tumor suppressor gene involved in cancer-chemoresistance likely remain to be identified as most studies have focused on a limited number of candidate genes (Strathdee *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2004). Therefore, a microarray-based screening pairing the differential genetic profile of sensitive and CDDP-resistant cell lines with an epigenetic reactivation approach has the advantage of a global analysis that should preferentially identify epigenetically silenced genes as a result of acquired CDDP-chemoresistance.

In this study, we first established two CDDP-resistant cell lines derived from the sensitive H23 and H460 NSCLC cell lines. Screening for genes differentially expressed in those resistant cells compared with their drug-sensitive parent cells and re-expressed after 5Aza-dC and TSA treatments is a new approach that can provide signatures for the identification of target genes for chemotherapy profiling. This process may lead to further elucidation of the biology of treatment response in NSCLC. We have identified a panel of genes showing this pattern, and found the *insulin-like growth factor-binding protein-3* (IGFBP-3) gene specifically downregulated through promoter-hypermethylation in the resistant phenotypes.

The biological significance of IGFBP-3 is of great importance in controlling cell growth, transformation and survival. It is the main IGFBP-family member, physiologically, IGFBP-3 binds IGF-I with stronger affinity than the specific IGF-I receptor (IGF1-R) to the cell membrane, blocking their interaction and, therefore, the IGF-I mitogenic and anti-apoptotic actions. It is induced by wild-type p53 and interacts with the TGF- β and EGFR pathways (Buckbinder *et al.*, 1995; Rajah *et al.*, 1997; Guix *et al.*, 2008). IGFBP-3 has been recently reported by the authors and others as a candidate tumor suppressor gene under epigenetic regulation in several tumor types including lung, kidney and ovarian cancer (Chang *et al.*, 2002b; Ibanez de Caceres *et al.*, 2006; Wiley *et al.*, 2006), and although its role in tumor progression has been studied, its function in acquired resistance to CDDP, chemotherapy response prediction as well as in drug-resistance phenotype identification remains to be characterized. In this study we examined the promoter methylation profile of IGFBP-3 regarding sensitivity to CDDP in 27 human cancer cell lines and in a panel of 36 NSCLC specimens. We report that a loss of IGFBP-3 expression mediated by aberrant promoter hypermethylation results in a reduction of tumor cell sensitivity to CDDP treatment in NSCLC.

Results

Establishment of NSCLC human cell lines resistant to CDDP

We established two human NSCLC cell lines resistant to CDDP, H23R and H460R, which were selected after a final exposure to 0.2 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ CDDP respectively,

showing approximately four times more drug resistance than the matched parental cell line (4.07 and 3.89 resistant index; $P < 0.001$ and $P < 0.002$) (Supplementary Figures 2a, b and c). Both cell lines showed a similar CDDP resistant-index to 41R ovarian cancer cells (4.8; $P < 0.001$) (Supplementary Figure 2c).

Identification of genes induced by 5Aza-dC and TSA treatment in CDDP-resistant cell lines

We identified a group of genes under direct or indirect regulation of 5Aza-dC and TSA that were involved in important tumor-related pathways, including cell growth, apoptosis and negative regulation of cell-cycle progression. It is interesting to note that only three genes were commonly re-expressed in both cell lines at similar levels to the sensitive parental cells. We also selected a second group of six genes specifically re-expressed in each cell line, representing, as expected, significant inter-individual variation in drug response (Figure 1a).

For gene validation, we first tested their expression profile by RT-PCR, confirming the results from microarray analyses in all nine genes analyzed. The expression of *ARRDC4*, *DKK1* and *DUSP5* was dramatically decreased in both H23R and H460R cell lines compared with their parental line, whereas a strong signal in H23R-T and H460R-T cells confirmed re-expression after 5Aza-dC and TSA treatment. *AREG*, *GDF-15* and *IGFBP-3* followed the same pattern in H23 cells, whereas *NNAT*, *PHLDA1* and *S100A2* did in H460 cells (Figure 1b). We previously reported that *GDF-15* was methylated in normal tissues (Ibanez de Caceres *et al.*, 2006); therefore, we next used bisulfite sequencing (BS) to validate the promoter-methylation status in the remaining genes containing a real CpG island. Promoters of *ARRDC4*, *DKK1*, *DUSP5*, *AREG* and *PHLDA1* were unmethylated in all experimental groups, indicating that they are not under direct epigenetic regulation, as an example, the methylation status of *ARRDC4* is shown in Figure 1c. The *NNAT* gene was methylated in DNA from non-neoplastic lung, H460 and H460R cells, suggesting possible epigenetic regulation that could explain the intense signal in H460R cells after reactivation treatment. Data from *DKK1*, *DUSP5*, *AREG*, *PHLDA1* and *NNAT* are shown in Supplementary Figure 3.

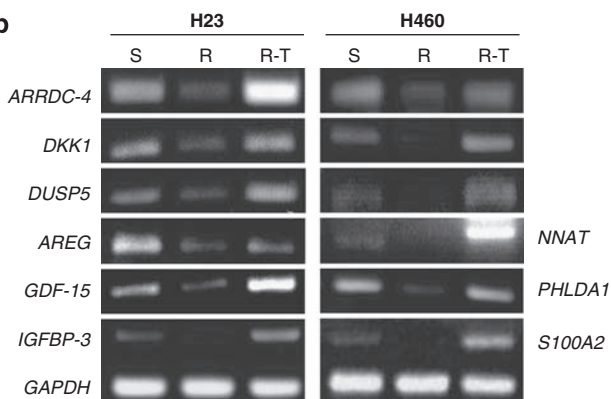
IGFBP-3 CpG-island study and methylation analysis

For IGFBP-3, we studied a promoter CpG island located $-518/+744$ from the first exon, where we examined the 688 bp upstream from the ATG site. The island was unmethylated in non-neoplastic lung tissue DNA, whereas H23R resistant-cells were more densely methylated than H23S, in accordance with the decrease observed in gene expression. In addition, re-activation treatment restored unmethylated promoter and gene expression in H23R (Figure 2). We used the matched 41S and 41R cells to verify that IGFBP-3-methylation status was directly related with the CDDP-resistance process, as ovarian cancer is, like NSCLC, a tumor type that exhibits frequent resistance after CDDP-based

a

Gene ID	Gene Name	Gene Symbol	Cell Lines	Chromosome Location	CpG Island	ALUs	Methylation
NM_183376	Arrestin domain containing 4	<i>ARRDC4</i>	H23/H460	15q26.3	Y	N	U
NM_012242	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	<i>DKK1</i>	H23/H460	10q11.2	Y	N	U
NM_004419	Dual specificity phosphatase 5	<i>DUSP5</i>	H23/H460	10q25	Y	N	U
NM_001657	Amphiregulin preproprotein	<i>AREG</i>	H23	4q13.3	Y	N	U
NM_004864	Growth differentiation factor 15	<i>GDF15</i>	H23	19p13.11	Y	N	U
NM_000598	Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>IGFBP-3</i>	H23	7p13	Y	N	M
NM_181689	Neuronatin, transcript variant 2	<i>NNAT</i>	H460	20q11.23	Y	N	U
NM_007350	Apoptosis-associated nuclear protein PHLDA1 mRNA	<i>PHLDA1</i>	H460	12q21.2	Y	N	U
NM_005978	S100 calcium binding protein A2	<i>S100A2</i>	H460	1q21.3	N	-	-

b



c

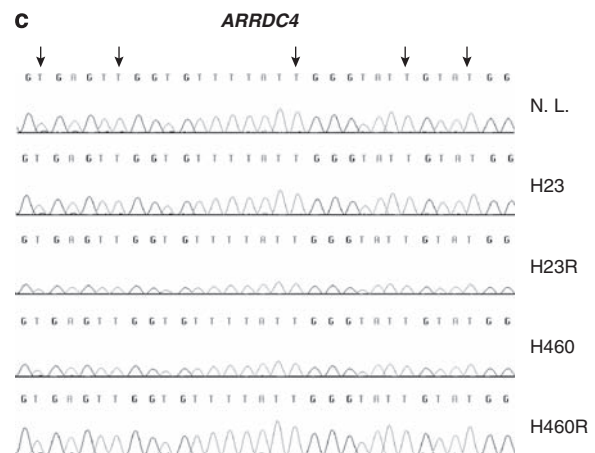


Figure 1 Identification of resistant genes under epigenetic regulation. (a) Selected genes meeting the described criteria, in both resistant cell lines (H23/H460) or in each cell line independently (H23 or H460). (b) RT-PCR in parental (S), resistant (R) and resistant cell lines under epigenetic reactivation (R-T). (c) Bisulfite sequencing of *ARRDC4* as an example of an unmethylated gene, indicated by the presence of T instead of C in the positions indicated by the arrows in all experimental groups: non-neoplastic lung tissue (NL), H23, H23R, H460 and H460R cell lines.

therapy. Supporting our results, we found the *IGFBP-3* promoter completely unmethylated in 41S cells and densely methylated in 41R cells, whereas 5-Aza-dC/TSA treatment again restored promoter unmethylation and gene expression, confirming that *IGFBP-3*-hypermethylation occurs in those cells as a CDDP resistance-specific process. Furthermore, using qRT-PCR, we confirmed that *IGFBP-3* expression was 1000-fold higher in 41S cells than in H23S cells, in which the *IGFBP-3* promoter is semi-methylated (Supplementary Figure 4). Accordingly, we established that *IGFBP-3*-methylation in 41R cells parallels a decrease in gene expression of more than 10 000-fold compared with 41S cells (Supplementary Figure 4), whereas reactivation treatment increased the expression by 10 times. These results indicate that hypermethylation of *IGFBP-3* is specific to CDDP-resistant cell lines.

IGFBP-3-promoter methylation mediates the response to CDDP

To investigate if *IGFBP-3*-promoter hypermethylation mediates chemosensitivity to CDDP or is a consequence of treatment, we silenced expression in 41S cells, as in

these cells *IGFBP-3* is highly expressed and therefore susceptible to being successfully knocked-down. Transfection of the siRNA-negative-control did not affect the *IGFBP-3* expression pattern in 41R and 41S cells (Figure 3a). *IGFBP-3* expression was successfully silenced in 41S cells with 75% interference efficiency 24 h after transfection, effect that was maintained after 72 h with an approximately 70% efficiency compared with 41S cells transfected with control-RNAi (Figure 3b). This *IGFBP-3* silencing induced a decrease in CDDP sensitivity compared with cells transfected with the negative control, resulting in a significant increase in the IC₅₀ value in response to CDDP (0.5 µg/ml vs 0.3 µg/ml, $P < 0.001$). Those cells showed an intermediate sensitivity degree between 41S and 41R cells transfected with the negative control, with a resistance index lower than 41R RNAi NC cells (1.67 vs 4.1, $P < 0.001$), in which *IGFBP-3* is completely silenced by promoter methylation (Figures 3c and d). These results confirm *IGFBP-3* promoter hypermethylation as an event that mediates the response to CDDP.

Next, CDDP viability response and *IGFBP-3* methylation status were measured in 23 additional cancer cell

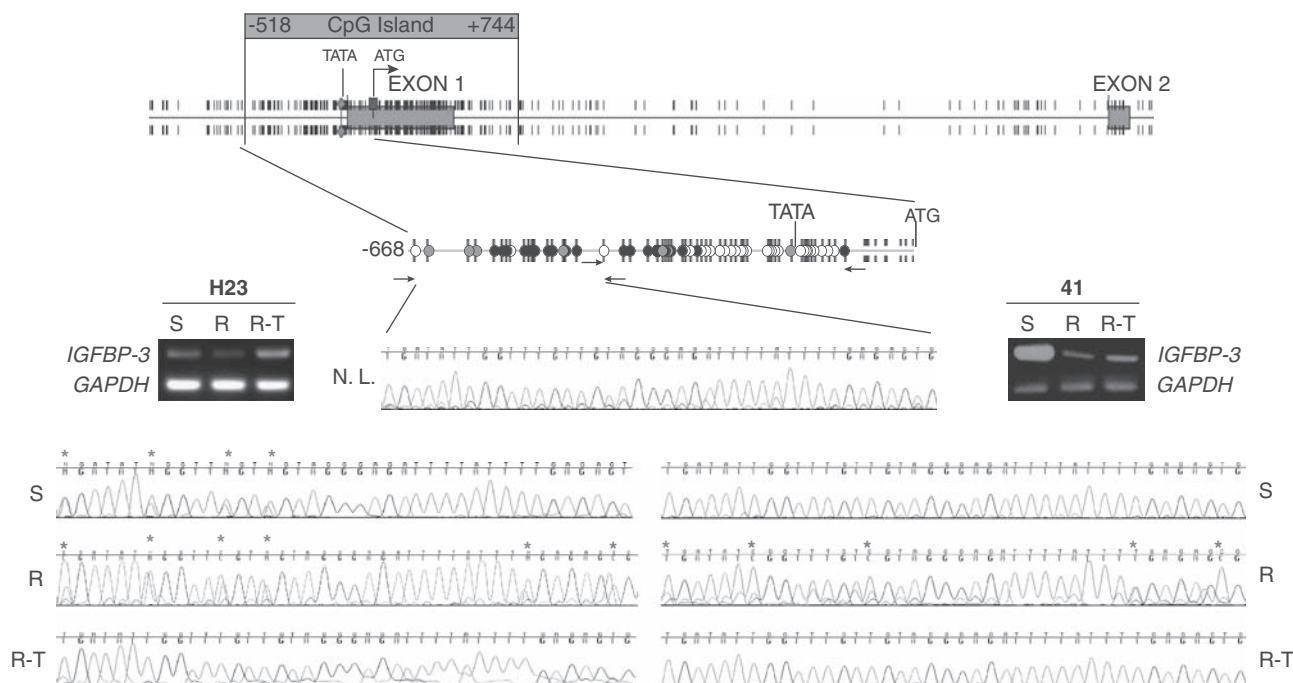


Figure 2 Bisulfite sequencing of the *IGFBP-3* gene promoter. Analysis of the CpG island from non-neoplastic lung tissue DNA (NL) and two sets of CDDP sensitive (S), resistant (R) and resistant-treated (R-T) cell lines derived from H23 (left set) and 41 (right set) cell lines. The CpG island location is indicated by the red square and covers the first exon. The area analyzed is that indicated between the two pairs of arrows at the top of the figure. Circles represent the methylation frequency of each CpG site analyzed from H23R and 41R cell lines; white: never or low methylation frequency (0–15%); gray: medium methylation frequency (15–30%) and black: high methylation frequency (>30%). The presence of C preceding a G in the sites indicated by the red asterisks demonstrates that these cytosines were methylated, whereas the blue ones indicate semi-methylated positions. The presence of T instead of C in the same positions in NL and in the R-T cell lines indicates unmethylated positions in no-tumor DNA and after epigenetic-reactivation treatment. RT-PCR of both sets linking the cell lines methylation profile is shown at the top of each set. A full colour version of this figure is available at the *Oncogene* journal online.

lines, in order to study the correlation between promoter hypermethylation and CDDP-resistance, and to confirm the most frequent methylation positions for the methylation-specific PCR (MSP) primer design (Supplementary Table 1). Results showed different viability responses to CDDP independently of tumor type. In all, 16 out of 23 (70%) cell lines showed low CDDP-sensitivity ($IC_{50} > 2.5 \mu\text{g/ml}$), with *IGFBP-3* methylated in 12 (75%), probably as a consequence of metastatic origin of cell lines (Supplementary Figure 1). The MSP primers designed by comparing the BS from the cell lines were used to analyze the *IGFBP-3*-methylation status in DNA from the formalin-fixed, paraffin-embedded-NSCLC tumors, as described below.

Specific methylation of *IGFBP-3* in CDDP-resistant NSCLC primary tumors

To determine whether *IGFBP-3* methylation is a frequent event in primary tumors that correlates with the response to CDDP, we exposed 36 stage I/II NSCLC fresh tumors to various CDDP concentrations, analyzed their *IGFBP-3*-methylation status by MSP and studied their correlation with clinical history. All baseline characteristics vs CDDP-sensitivity and methylation status are summarized in Table 1, whereas individual patient data are listed in Supplementary Table 2.

According to receiver operating characteristic methodology, the IC_{50} index clearly delineated two groups of

patients in terms of the sensitive or resistant profile to CDDP. The cut-off point was established on an IC_{50} of $7.5 \mu\text{g/ml}$. Under these conditions, 19 out of the 36 samples were above this cut-off, and therefore, considered to have low sensitivity to CDDP, whereas 17 samples out of 36 were under this cut-off and considered highly sensitive. *IGFBP-3* was more frequently methylated in resistant (14 out of 19, 74%) than in sensitive tumors (2 out of 17, 12%) ($P < 0.001$); in addition, *IGFBP-3* was unmethylated in 15 out of the 17 (88%) highly sensitive samples (Figure 4c and Table 1). Consequently, we found an 81% (29 out of 36 samples) correlation between *IGFBP-3*-methylation status and response to CDDP (Figure 4c). In addition, we did not detect any CpG-site methylation in ten additional non-neoplastic lung samples. DNA extracted from three fresh samples was used to test *IGFBP-3*-methylation as an internal control for the MSP analysis (Figure 4b). An MSP sample is shown in Figure 4a; patients 22 and 34 are unmethylated, whereas 19, 6 and 30 are methylated, linking with the BS shown in Figure 4b.

When comparing data from pooled patients according to stage and methylation status of the *IGFBP-3*-promoter, we observed that patients diagnosed with pathological stage I, whose tumors harbor an unmethylated promoter, had a clearly increased DFS compared with methylated stage I patients. In addition, a clear trend of unmethylated stage I patients towards higher

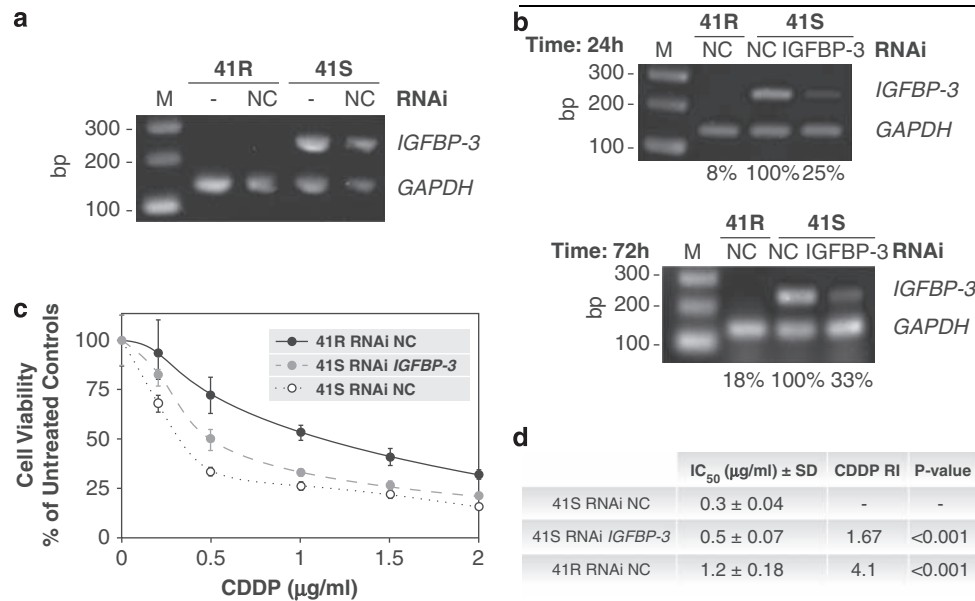


Figure 3 Effect of *IGFBP-3* silencing on sensitivity to CDDP. **(a)** *IGFBP-3* expression after transfection with siRNA negative control (NC) in 41S and 41R cells **(b)** *IGFBP-3* mRNA levels in 41R and 41S cells transfected with siRNA against *IGFBP-3* or NC at 24 and 72 h after transfection. cDNA quantity was estimated by PCR amplification of the *GAPDH* gene using ImageJ 1.37V N (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) **(c)** Viability curves of 41S cells transfected with siRNA against *IGFBP-3* (41S RNAi *IGFBP-3*) or with the negative control (41S RNAi NC) and 41R cells transfected with the negative control (41R RNAi NC), to CDDP at six different test-drug concentrations. Data were normalized to each untreated control, set to 100%. Data represent the mean ± s.d. of at least three independent experiments carried out with eight wells at each drug concentration for every cell line analyzed. **(d)** Data represent the IC₅₀, inhibitory concentration that kills 50% of the cell population 48 h after CDDP exposure; the CDDP-RI, or resistance index to CDDP was calculated as (IC₅₀ from 41S RNAi *IGFBP-3* or 41R RNAi NC)/(IC₅₀ 41S RNAi *IGFBP-3*) ± the s.d. $P < 0.01$ was considered a significant change in drug sensitivity (Student's *t*-test). M, marker; bp, base pair.

Table 1 Baseline characteristics of included patients. Correlation between methylation status, resistance to cisplatin and clinical/pathological characteristics are shown

	N (%)	Methylated	Unmethylated	P	Sensitive	Resistant	P
<i>Stage</i>							
Stage I	22 (61.1)	12	10	0.172	7	15	0.043
Stage II	13 (36.1)	4	9		9	4	
Stage unknown	1 (2.8)	0	1		1	0	
<i>TNM</i>							
T1	9 (25)	6	3	0.288	0	9	0.005
T2	22 (61.1)	9	13		13	9	
T3	4 (11.1)	1	3		3	1	
T unknown	1 (2.8)	0	1	0.460	1	0	0.245
N0	26 (72.2)	13	13		10	16	
N1	9 (25)	3	6		6	3	
N unknown	1 (2.8)	0	1		1	0	
<i>Histology</i>							
Epidermoid	22 (61.1)	9	13	0.427	11	11	0.64
Adenocarcinoma	10 (27.8)	4	6		5	5	
Large cell	4 (11.1)	3	1		1	3	
<i>In vitro resistance to cisplatin</i>							
Resistant	19 (52.8)	14	5	<0.001			
Sensitive	17 (47.2)	2	15				

survival was evident in all strata (Figure 5b), but without statistical significance, mainly because of a small sample size (Figure 5a). Surprisingly, for stage II

patients we observed the opposite scenario: patients that harbor an unmethylated promoter had a lower DFS than those methylated within the same stage.

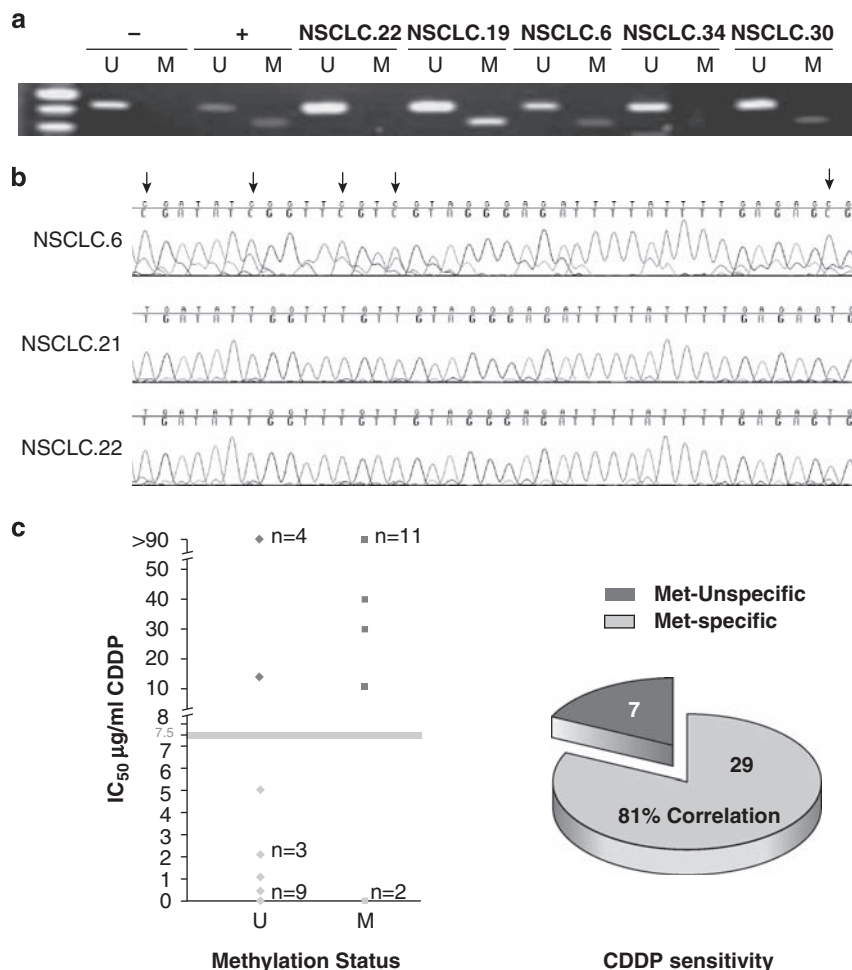


Figure 4 MSP of *IGFBP-3* in primary NSCLC tumors. **(a)** MSP example in the analyzed tumor samples: Presence of a PCR product in the methylated lane (M) indicates methylated alleles for *IGFBP-3*. PCR product in the unmethylated lane (U) from tumor DNA most likely arises from normal cell contamination of the tumor specimen. Tumor cell lines 41R and H1299 and primary tumors 5 and 15 were used indistinctly as positive controls, whereas cell line 41S and primary tumors 21 y 29 as negative controls. **(b)** BS of three primary tumors confirms MSP primer specificity. Arrows point to the methylated cytosines in sample 6. **(c)** The left figure represents CDDP sensitivity from the 36 NSCLC samples using the IC_{50} value against their methylation status. Samples with $IC_{50} \geq 7.5$ μg/ml are considered resistant to CDDP. The right panel represents the correlation between methylation status and CDDP sensitivity. Met-specific represents samples whose response to CDDP correlates with *IGFBP-3* methylation status, whereas Met-unspecific represents samples with no correlation.

Discussion

A central issue to better understanding the natural history of NSCLC is why disease becomes refractory to CDDP-based chemotherapy treatment. Cisplatin has extensive antitumoral activity, whereas its toxicity in normal tissues is relatively restricted to specific cellular types such as gastrointestinal enterochromaffin cells, kidney convoluted tubules or dorsal root ganglia (McKeage, 1995), suggesting an epigenetic influence in toxicity. In addition, CDDP exposure is associated with drug-induced DNA hypermethylation *in vitro* (Nyce, 1989) and clinically (Koul *et al.*, 2004), indicating the importance of epigenetic changes in the rapid induction of resistance.

Most studies involving epigenetic chemotherapy-acquired resistance have focused on a limited number of candidate genes, such as *p16* (Katsaros *et al.*, 2004),

RASSF1A (Yoon *et al.*, 2001; Makarla *et al.*, 2005) or *hMLH1* (Strathdee *et al.*, 1999), which possibly contribute to resistance in ovarian, lung and other cancers. Here, we developed a microarray-based strategy to identify new potential targets of promoter hypermethylation in CDDP-resistant phenotypes in lung cancer, which are therefore potentially involved in the development of resistance. We established the cell lines H23R and H460R, with a CDDP-resistant index in accordance with the previously established cancer cell line 41R, assuming that similar resistant events could follow. NSCLC-resistant cell lines underwent epigenetic treatment, and were then compared with the parental and resistant cell lines through microarray assays. The ontology analysis identified a set of genes involved in several tumor progression pathways, similarly to a recently published genomic approach that identified apoptosis as one of the most represented

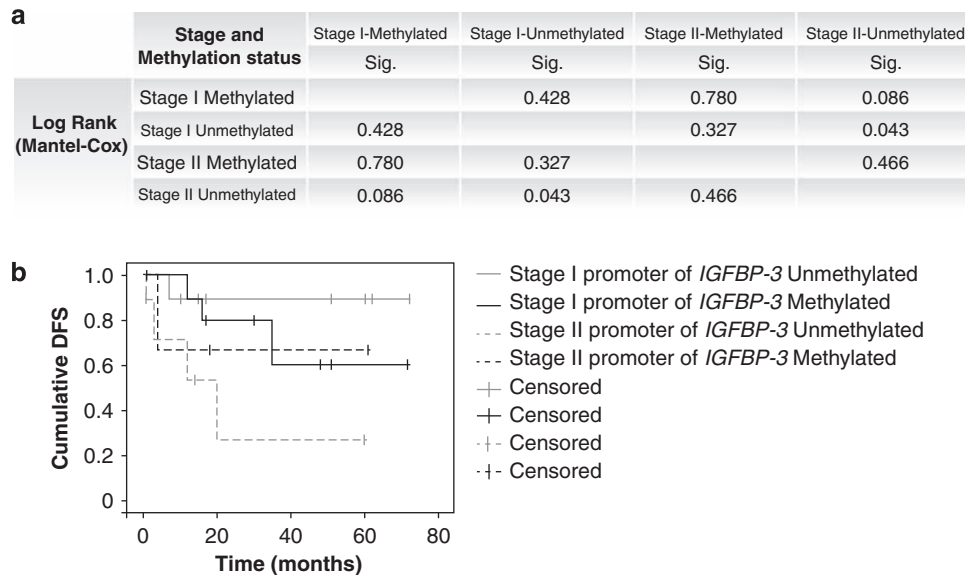


Figure 5 Pair comparison and Kaplan–Meier. Comparison between stages, *IGFBP-3* methylation status and cumulative disease-free survival in 36 patients diagnosed with stage I and II NSCLC.

pathways associated with CDDP-resistance (Riedel *et al.*, 2008).

From the nine genes selected for further validation, three were commonly re-expressed in both resistant cell lines, whereas six other genes were specific for each cell line, indicating that CDDP and 5Aza-dC/TSA treatments affect different groups of genes and/or biological pathways, which could explain the high inter-individual variation in drug response described in lung cancer patients (Herbst *et al.*, 2008). Further validation confirmed that all genes had basal expression in the parental cells, which highlights their importance in maintaining the sensitive phenotype, as they lacked or strongly diminished their expression in resistance. Confirming the relevance of our approach to identifying ‘resistance-inductor-genes’, it is interesting to note that the decreased expression of *DKK1* has been recently associated with acquired CDDP resistance in head and neck cancer (Gosepath *et al.*, 2008). Epigenetic validation revealed that only one gene from our panel, *IGFBP-3*, had specific promoter methylation in CDDP-resistance, thereby indicating that the remaining genes are not under direct epigenetic regulation although their re-expression after 5Aza-dC/TSA treatment confirms recent findings (Morris *et al.*, 2008). Those genes could be activated by an upstream regulatory gene or transcription factor whose expression was reactivated by demethylation, as is the reported case of gene *TGM2*, which is re-expressed in kidney cancer but epigenetically regulated upstream by *RASSF1A* (Ibanez de Caceres *et al.*, 2006).

We focused on the epigenetic regulation of *IGFBP-3*. Our results show *IGFBP-3* strongly silenced by promoter hypermethylation in 41R and H23R-resistant cells in comparison with respective parental cells, with marked *IGFBP-3*-basal expression. In addition, demethylation treatment restored the unmethylated CpG positions as well as gene expression, thus confirming the epigenetic

regulation of *IGFBP-3* in CDDP-resistant cell lines. Moreover, *IGFBP-3* was more highly expressed in the unmethylated cell line 41S than in H23 cells, which *IGFBP-3*-promoter is semi-methylated. Those results confirm the correlation between the decrease in *IGFBP-3* expression regulated by promoter hypermethylation and the loss of CDDP sensitivity. Furthermore, we here report that the *IGFBP-3*-promoter hypermethylation event is responsible for and not a consequence of CDDP-acquired resistance. This is because silencing of *IGFBP-3* expression in the 41S cells induced a strong decrease in CDDP sensitivity with a relative resistance index transitional to resistant 41R and sensitive 41S cells. We also tested the specificity of aberrant *IGFBP-3*-promoter methylation to detect CDDP sensitivity in primary tumors, and found that most of CpG dinucleotides were methylated in resistant but not in sensitive primary samples, indicating a significant correlation between *IGFBP-3*-methylation and CDDP chemosensitive-response. *IGFBP-3* was methylated in some patients before clinical exposure to CDDP, suggesting a possible intrinsic resistance to the drug. In fact, a follow-up study of those patients after chemotherapy treatment showed that patients diagnosed with pathological stage I and harboring an unmethylated *IGFBP-3* promoter had a clear trend towards higher survival, evident in all strata, compared with other groups. Our sample size was not large enough to demonstrate a statistically significant difference between all groups, but it is a starting point for future studies. The surprising results obtained from stage II patients are also size-limited, but it is possible that adjuvant therapy typically administered for stage II patients could have a role in observed differences within this stage. Unfortunately, we have no full data about adjuvant therapy administered in our set of patients.

From our results, we report that *IGFBP-3*-methylation could be a master key used for cell tumor

progression in conjunction with its biological functions. Induction of *IGFBP-3* gene expression by wild-type p53 is associated with enhanced secretion of an active form of *IGFBP-3* capable of inhibiting mitogenic signaling by the IGF-I (Buckbinder *et al.*, 1995). The CGH profile of cell lines 41S and 41R indicate no changes in chromosome 17, whereas p53 is located at (17p13) (Leyland-Jones *et al.*, 1999), indicating that *IGFBP-3* promoter methylation at the p53 regulatory element could cause gene silencing resistant to p53 in those cell lines. The IGF-I signaling pathway could mediate chemotherapy resistance of NSCLC cells through the activation of Akt/mTOR-mediated synthesis of survival proteins, thus protecting NSCLC cells from apoptosis induced by several drugs, as reported previously with drugs that inhibit tyrosine-kinase receptors including EGFR or IGFIR (Morgillo *et al.*, 2006, 2007). Those authors suggest that resistance is caused by the activation of alternative cell survival signaling mechanisms, because those drugs do not inhibit proliferation at doses sufficient to suppress EGFR activation. In fact, we observed decreased expression of *IGFBP-3* in chemoresistant cell lines, therefore a higher amount of IGF-I should be available to join its own receptor and strongly activate the IGFIR pathway, inducing survival and maintaining proliferation in CDDP-resistant cells. In addition, in a p53 and/or IGF-I-independent pathway, methylation could also be the mechanism responsible for inhibiting the apoptosis mediated by *IGFBP-3* through the activation of the TGF- β receptor T β R-V, (Rajah *et al.*, 1997; Huang and Huang, 2005).

IGFBP-3-methylation has been correlated with clinicopathological features indicative of poor prognosis in prostate and ovarian cancers (Wiley *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2007) and in the early stages of NSCLC patients (Chang *et al.*, 2002a, 2002b), likely indicating that those patients have intrinsic resistance to CDDP. However, we know that those patients with unmethylated *IGFBP-3* in early stages could also progress towards a methylated promoter after CDDP treatment, thus showing acquired resistance. A follow-up study after chemotherapy treatment measuring aberrant *IGFBP-3* methylation in tumor DNA circulating in body fluids such as blood, bronchioalveolar fluid or saliva could identify this situation when CDDP-resistant cells arise, providing a non-invasive test to predict chemotherapy resistance.

In this study, we report that *IGFBP-3* has an inverse effect on the risk of NSCLC CDDP chemoresistance development. CDDP induces changes in *IGFBP-3* expression mediated by the acquisition of promoter hypermethylation, which promotes resistance to CDDP through various biological pathways. Therefore, basal methylation status of the *IGFBP-3* promoter before chemotherapy treatment may be a clinical biomarker predictor of the chemotherapy outcome of NSCLC patients, identifying those who are most likely to benefit from CDDP therapy. These results represent a new application of epigenetic cell control in chemotherapy resistance. This application involves the possible use of new highly sensitive and non-invasive tests based on the detection of aberrant methylation in tumor-circulating

DNA (Carvalho *et al.*, 2008), as well as the use of agents that reverse epigenetic changes. These agents have shown promising results in a mouse model of lung carcinogenesis and are being tested in lung cancer patients (Belinsky *et al.*, 2003)

Materials and methods

Cell culture and viability to CDDP

A total of 23 human cancer cell lines (Supplementary Figure 1), representing nine different cancer types, were purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA) or the ECACC (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and cultured as recommended. The CDDP-resistant variants H23R and H460R were established following the methodology described previously (Plasencia *et al.*, 2006) and further detailed in Supplementary Materials and Methods (Roninson, 2003; Chattopadhyay *et al.*, 2006; Levina *et al.*, 2008). To validate the results obtained from the resistant cell lines established in our laboratory, we also used CDDP-sensitive and resistant ovarian cancer cell lines 41M and 41MR, hereafter called 41S and 41R respectively, kindly provided by Dr Lloyd R Kelland (UK), and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS.

NSCLC clinical samples and data collection

Fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded surgical specimens were obtained from 36 patients who had undergone a complete resection (R0) for a histologically confirmed, early NSCLC. All patients had both a perioperative PET-CT scan showing localized disease and a pathological confirmation of stage I/II. In addition, an age of 18 years or older, intraoperative mediastinal-node dissection for reliable mediastinal staging or biopsy of nodes at N3 without any evidence of disease was inclusion criteria. Stage III, any involvement of tracheobronchial angle nodes (station 10), mixed histological features and previous diagnosis of cancer within the last 5 years were exclusion criteria. Histological slides obtained from each block were reviewed by an expert pathologist (M Nistal) to confirm the diagnosis and to guarantee at least 90% tumoral content. A total of 10 samples obtained from pulmonary biopsies with non-neoplastic lung pathology were used as control tissues. Follow-up was carried out according to the criteria used in the Medical Oncology Division from the University Hospitals La Paz and 12 de Octubre, including clinical assessments and thorax CT every 3 months for 2 years and every 6 months thereafter. Clinical, pathological and radiological data were recorded by an independent observer at the H. La Paz and blinded for statistical analysis.

5Aza-2dC and TSA treatment

5Aza-dC and TSA (Sigma-Aldrich) were stored as 5 mM and 330 μ M stock solutions, respectively. For re-expression studies, resistant cell lines H23R, H460R and 41R were split to low density and exposed to 5Aza-dC and TSA or to PBS and ethanol (mock cells) as described previously (Ibanez de Caceres *et al.*, 2006).

Oligonucleotide array hybridization and gene selection

Parental H-23 and H-460 cell lines, derived CDDP-resistant cell lines and resistant cell lines treated with 5Aza-dC and TSA were used for the oligonucleotide array hybridization. Total RNA was isolated and purified as described (Ibanez de Caceres *et al.*, 2006) and used for the microarray and RT-PCR analysis. The microarray assay was carried out using the

Agilent gene expression platform 4X44 Whole Human Genome Oligo Microarray Kit, representing the 41 000 known genes and transcripts in the human genome. Sample amplification, labeling and scanning procedures followed the Agilent microarray protocol and are further described in Supplementary Materials and Methods.

Reverse transcription and qRT-PCR

Semiquantitative and real-time RT-PCR assays were carried out in all the experimental groups. In all, 5 µg of total RNA was reverse transcribed using oligo (dT)24 primer and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For quantitative real-time RT-PCR analysis, the amount of 1 µg of total RNA was retrotranscribed by High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Next, each cDNA sample was analyzed in triplicate using the ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Madrid, Spain). Real-time PCR was carried out using Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain), containing ROX to normalize emissions. Primers and probe for *IGFBP-3* expression analysis were purchased from Applied Biosystems (Assay ID: Hs00181211_m1). Relative gene expression quantification was calculated according to the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using *GADPH* and *18S rRNA* as endogenous control genes and the H23S and 41S cell lines as calibrators. Normalized expression values were determined as follows: $10^{-(\Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ calibrator})}$, where ΔC_t values were calculated by subtracting the C_t value of the target gene from the value of the mean between endogenous control genes. PCR settings and primer sequences are listed in Supplementary Materials and Methods and Supplementary Table 1.

siRNA transfection

The 41S and 41R cell lines were transfected with 150 nM *IGFBP-3* siRNA or negative control siRNA (HSS105266, Stealth Select RNAi and 2935–200, stealth RNAi Negative Control, Invitrogen, Barcelona, Spain) according to manufacturer directions. For the viability assay, cells were seeded in 24-well dishes at 50 000 cells per well 24 h after transfection with *IGFBP-3* siRNA or siRNA control, then treated with six different doses of CDDP for an additional 48 h and stained following the method described previously (Chattopadhyay et al., 2006). Cell viability was estimated relative to the density recorded over the same experimental group without drug exposure at same period of time (24 h following seeding of cells). Simultaneously, same experimental groups were seeded at 500 000 cells per plate and harvested at same incubation periods, 24 and 72 h after siRNA transfection, as a time-course to test by RT-PCR the preservation of siRNA effects on *IGFBP-3* expression.

BS and methylation-specific PCR

DNA from human cancer cell lines, NSCLC primary specimens and non-neoplastic lung tissues were isolated, bisulfite modified and then used for BS and MSP analysis as described (Ibanez de Caceres et al., 2006). PCR settings and primer sequences for BS and MSP are listed in Supplementary Materials and Methods and Supplementary Table 1.

Culture and CDDP treatment of human cancer tissues

To measure the sensitivity of the 36 primary NSCLC samples to CDDP, fresh tumors were minced, passed through a nylon mesh and enzyme disaggregated with collagenase type II and hyaluronidase in Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12/Ham media (Sigma-Aldrich) with antibiotics. Cells were resuspended in 96-well microtiter plates followed by exposure to various concentrations of CDDP as described in Supplementary Materials and Methods.

Statistical analysis

Differentially expressed genes from the microarray analysis were selected using as a statistical method the *t*-test unpaired algorithm with Benjamini Hochberg as the FDR correction method for multiple testing corrections. Statistically significant ($P < 0.05$ as adjusted *P*-value) genes were selected. Calculations were carried out using the gene expression analysis software GeneSpring (further details in *Oligonucleotide array hybridization and gene selection* from Supplementary Materials and Methods).

Receiver operating characteristic curves from NSCLC patients were obtained to identify the relation between sensitivity and resistance rate at a specific cut-off value established according to the best combination of sensitivity and false-positive rate (1-specificity) (1;0).

The Kaplan-Meier method was used to plot cumulative disease-free survival curves for patients diagnosed with stage I and unmethylated *IGFBP-3* promoter, stage I methylated, stage II unmethylated and stage II methylated. Differences were compared with the log-rank method for every stratum. For patients without any evidence of relapse at the time of analysis, data on disease-free survival were censored at the time of last contact. Disease-free survival was defined as the time from surgery to clinical, radiological or histological evidence of relapse. Discrete variables (histology, T, N, stage, gender and methylation status at the *IGFBP3* promoter and *in vitro* sensitivity/resistance to CDDP) were compared with the χ^2 test and corrections with Fisher's exact test were made when needed. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Statistical analyses were done by using the SPSS software (version 17.0).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Javier Perez for the artwork and to J Siegfried, for the English correction of the manuscript. Ibanez de Caceres was partially supported by the Fondo de Investigacion Sanitaria (ISCIII) through the 'Miguel Servet' program (CP 08/000689; PI-717). *Note:* Supported by FIS PI06-1234, PI08-1485, PS09/00472 and Fundación Médica Mutua Madrileña.

References

- (2003). The World Cancer Report—the major findings. *Cent Eur J Public Health* **11**: 177–179.
- Baker EK, Johnstone RW, Zalcberg JR, El-Osta A. (2005). Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **24**: 8061–8075.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* **72**: 141–196.
- Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH et al (2003). Inhibition of DNA methylation and histone

- deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* **63**: 7089–7093.
- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR *et al* (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**: 646–649.
- Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO *et al* (2008). Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**: 97–107.
- Chang YS, Kong G, Sun S, Liu D, El-Naggar AK, Khuri FR *et al* (2002a). Clinical significance of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **8**: 3796–3802.
- Chang YS, Wang L, Liu D, Mao L, Hong WK, Khuri FR *et al* (2002b). Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **8**: 3669–3675.
- Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Beldaniesta C, Moratilla C, Cepas P *et al* (2006). MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **25**: 3335–3345.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* **59**: 793–797.
- Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, von Jonquieres G, Lage H *et al* (2008). Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int J Cancer* **123**: 2013–2019.
- Gottesman MM. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* **53**: 615–627.
- Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S *et al* (2008). Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* **118**: 2609–2619.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med* **359**: 1367–1380.
- Huang SS, Huang JS. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* **96**: 447–462.
- Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. (2006). Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res* **66**: 5021–5028.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T *et al* (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**: 71–96.
- Katsaros D, Cho W, Singal R, Fracchioli S, Rigault De La Longrais IA, Arisio R *et al* (2004). Methylation of tumor suppressor gene p16 and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **94**: 685–692.
- Koul S, McKiernan JM, Narayan G, Houldsworth J, Bacik J, Dobrzynski DL *et al* (2004). Role of promoter hypermethylation in cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* **3**: 16.
- Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS ONE* **3**: e3077.
- Leyland-Jones B, Kelland LR, Harrap KR, Hiorns LR. (1999). Genomic imbalances associated with acquired resistance to platinum analogues. *Am J Pathol* **155**: 77–84.
- Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, Toyooka KO, Toyooka S, Minna JD *et al* (2005). Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res* **11**: 5365–5369.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* **91**: 137–168.
- McKeage MJ. (1995). Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf* **13**: 228–244.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC *et al* (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**: 686–692.
- Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee HY. (2007). Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* **13**: 2795–2803.
- Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee HY. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* **66**: 10100–10111.
- Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T *et al* (2008). Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **98**: 496–501.
- Nyce J. (1989). Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance in human tumors. *Cancer Res* **49**: 5829–5836.
- Nyce JW. (1997). Drug-induced DNA hypermethylation: a potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. *Mutat Res* **386**: 153–161.
- Perry AS, Loftus B, Moroosse R, Lynch TH, Hollywood D, Watson RW *et al* (2007). In silico mining identifies IGFBP3 as a novel target of methylation in prostate cancer. *Br J Cancer* **96**: 1587–1594.
- Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. (2006). Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. *Int J Oncol* **29**: 225–235.
- Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. (2000). Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* **60**: 6039–6044.
- Rajah R, Valentinis B, Cohen P. (1997). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 12181–12188.
- Riedel RF, Porrello A, Pontzer E, Chenette EJ, Hsu DS, Balakumaran B *et al* (2008). A genomic approach to identify molecular pathways associated with chemotherapy resistance. *Mol Cancer Ther* **7**: 3141–3149.
- Roninson IB. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* **63**: 2705–2715.
- Shen DW, Su A, Liang XJ, Pai-Panandiker A, Gottesman MM. (2004). Reduced expression of small GTPases and hypermethylation of the folate binding protein gene in cisplatin-resistant cells. *Br J Cancer* **91**: 270–276.
- Steele N, Finn P, Brown R, Plumb JA. (2009). Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity *in vivo*. *Br J Cancer* **100**: 758–763.
- Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, Brown R. (1999). A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene* **18**: 2335–2341.
- Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, Yu H. (2006). Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **16**: 210–218.
- Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. (2001). Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer* **94**: 212–217.
- Zhang P, Wang J, Gao W, Yuan BZ, Rogers J, Reed E. (2004). CHK2 kinase expression is down-regulated due to promoter methylation in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* **3**: 14.
- Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **61**: 249–255.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)



MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF- κ B and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer

María Cortes-Sempere^{a,b,1}, Sharmila Chattopadhyay^{g,1}, Ana Rovira^{e,f},
Vanessa Rodriguez-Fanjul^{a,b}, Cristobal Belda-Iniesta^c, Marian Tapia^{e,f}, Paloma Cejas^c,
Rosario Machado-Pinilla^{a,b}, Cristina Manguan-García^{a,b}, Isabel Sánchez-Pérez^{a,b},
Manuel Nistal^d, Carmen Moratilla^a, Javier de Castro-Carpeño^c, Manuel Gonzalez-Barón^c,
Joan Albanell^{e,f}, Rosario Perona^{a,b,*}

^a Translational Oncology Unit C.S.I.C./U.A.M.: Instituto de Investigaciones Biomédicas C.S.I.C./U.A.M., C/Arturo Duperier, 4, Madrid 28029, Spain

^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) Valencia, C/Álvaro de Bazán, 10 Valencia, Spain

^c Medical Oncology Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain

^d Pathology Department Hospital La Paz, Madrid, Spain

^e Medical Oncology Department, Hospital del Mar-IMAS, Barcelona, Spain

^f Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar, PRBB, Barcelona, Spain

^g Department of Pathology, University of California, San Diego, CA, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2009

Received in revised form 21 May 2009

Accepted 25 May 2009

Keywords:

Non-small cell lung cancer

MKP1/DUSP1 siRNA

Jun kinase

NF- κ B/relB

PI3K/Akt

Cisplatin

Bortezomib

Proteasome

ABSTRACT

Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) with cisplatin has a level of antitumor activity still modest. We have shown previously that MKP1/DUSP1 inhibits cisplatin-induced apoptosis in NSCLC cells and is overexpressed in tumors from most patients with stage I–II NSCLC. Here, using different NSCLC cell lines we found that MKP1 and NF- κ B are differentially expressed. We studied whether targeting MKP1, NF- κ B or both affects cisplatin-induced cell death. MKP1 is expressed in H460 and H727 cells. H727 and H1299 cells showed constitutive phosphorylation of Akt and increased NF- κ B activity than did H460 cells. H460-MKP1-siRNA-expressing cells (but not H727-MKP1-siRNA or H1299-MKP1-siRNA cells) exhibit a marked increase in cisplatin response compared with parental cells. Treatment with the PI3K inhibitor LY294002 or the NF- κ B inhibitor BAY11-7082 enhanced cisplatin antitumor activity in parental H1299 cells but only weakly affected responses of H727 and H460 cells. MKP1-siRNA expression enhanced the chemosensitization effect of LY294002 and BAY11-7082 on H727 and H460 cells. Additionally, NSCLC cell lines with higher NF- κ B-constitutive activation were the most sensitive to PS-341 (Bortezomib), a non-specific NF- κ B inhibitor. This finding suggests the proteasome as a suitable strategy in treating NSCLC tumors with high constitutive NF- κ B activity. Altogether, these results showed that either an activated PI3K/Akt/NF- κ B pathway and/or high MKP1 was linked to reduced sensitivity to cisplatin in NSCLC cells. Inhibition of NF- κ B or PI3K potentially enhanced cisplatin cytotoxicity in cells with endogenous or genetically induced low MKP1 levels. These findings support the potential improvement in cisplatin responses by co-targeting NF- κ B or Akt and MKP1.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: CDDP, cisplatin; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

* Corresponding author. Address: Translational Oncology Unit C.S.I.C./U.A.M.: Instituto de Investigaciones Biomédicas C.S.I.C./U.A.M., C/Arturo Duperier, 4, Madrid 28029, Spain. Tel.: +34 91 5854463; fax: +34 91 5854401.

E-mail address: RPerona@iib.uam.es (R. Perona).

¹ These authors contributed equally to this manuscript.

1. Introduction

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer. Systemic treatment of advanced/metastatic NSCLC and, more recently, of high-risk surgically

treated patients, involves mainly the use of cisplatin-based chemotherapy. Cisplatin is a DNA-interactive agent that induces lesions in the DNA by forming monoadducts and intra- and interstrand cross-links [1]. Cell death is then mediated by inducing a sustained activation of *N*-terminal c-Jun kinase (JNK) and p38 kinase [2–4]. Unfortunately, the clinical efficacy of cisplatin in NSCLC patients is still far from optimal. This may be related, at least in part, to the presence of various survival pathways in malignant cells that limit or counteract platinum antitumor effects. Upon cisplatin exposure, tumor cells activate survival pathways, including those mediated by dual specific phosphatase MKP1 (DUSP1) [2–4], PI3K [5] and the transcription factor nuclear-factor kappaB (NF- κ B) [6]. Gaining further knowledge on the role of these pathways in chemoresistance should lead to novel strategies to enhance cisplatin activity.

MKP1 is an immediate early gene regulated at the transcriptional level by mitogenic, inflammatory, and DNA-damaging stimuli [3,7,8]. Dephosphorylation and inactivation of JNK by MKP1 protects against cisplatin-induced apoptosis [2]. With regards to NSCLC, we have reported that MKP1 plays an important function in NSCLC tumor growth and in response to cisplatin treatment [9]. NSCLC cells expressing a small interfering RNA (siRNA) of MKP1 were more sensitive to cisplatin and grew more slowly when injected into nude mice. Chemical compounds that inhibit, non-specifically, MKP1 expression also induced higher sensitivity to cisplatin. Furthermore, these effects of MKP1 were very specific because inhibition or overexpression of an MKP1-related phosphatase, MKP2, did not alter tumor growth or response to cisplatin in NSCLC cells [9]. These results suggested MKP1 as a novel target for tumor regression and, particularly, for chemosensitizing NSCLC to cisplatin. Since high expression of MKP1 has been reported in NSCLC [7] MKP1 may have implications to improve lung cancer treatment strategies. In addition to MKP1, both PI3K/Akt and NF- κ B survival pathways can also limit cisplatin antitumor effects in lung cancer [5]. Further characterization of these pathways is needed, taking in consideration that inhibitors of PI3K and NF- κ B are in extensive preclinical and early clinical development.

Class I PI3K comprises a family of heterodimeric complexes, each composed of a p110 catalytic subunit and an adaptor subunit that exists predominantly as p85 [10,11]. PI3K phosphorylates PI(4)P and PI(4,5)P to produce PI(3,4)P₂ and PI(3,4,5)P₃, which recruit proteins such as Akt/protein kinase B [10] to the cytoplasmic membrane. In turn, Akt inactivates pro-apoptotic proteins such as BAD and caspase-9, thus promoting cell survival [12–14]. With regards to NSCLC, increased gene copy number of PI3K catalytic subunit α and phosphorylated Akt expression has been observed in clinical specimens. In addition, inhibition of PI3K/Akt by pharmacological or genetic approaches reduced proliferation in some NSCLC cancer cell lines [15–18].

NF- κ B comprises a family of inducible transcription factors that, among many other roles, protect cells from apoptosis induced by several chemotherapeutic agents [6,19]. In unstimulated cells, NF- κ B forms cytoplasmic dimmers associated with a family of inhibitory molecules known

as I κ Bs [20,21]. There are two known NF- κ B pathways [22]. In the canonical pathway, activation of NF- κ B involves the phosphorylation of I κ Bs through the I κ B kinase signalosome complex [23–25]. This is followed by rapid ubiquitin-dependent degradation by the 26S proteasome. This allows NF- κ B dimmers, mainly p65/p50, to translocate to the nucleus where they stimulate expression of target genes. In the non-canonical pathway, the p100-ReI β complex is activated by an I κ K α homodimer [26]. Notably, cisplatin activates NF- κ B through MEK1, and this activation is modulated by c-Jun, the main substrate of the JNK pathway [27]. This effect, again, can limit cisplatin-induced cell death. Many current antitumor therapies seek to block NF- κ B activity as a means of inhibiting tumor growth or sensitizing the tumor cells to chemotherapy [28]. Bortezomib (PS-341, VelcadeTM) is a potent and selective inhibitor of the chymotryptic activity of the 20S proteasome with a cytotoxic activity in several malignant cell lines. It has clinically proven efficacy in patients with multiple myeloma and malignant lymphoma [29]. The earliest mechanism of action attributed to Bortezomib was the inhibition of NF- κ B signaling by stabilizing I κ B. Besides, proteasome inhibitors have a number of additional mechanisms of action beyond NF- κ B inhibition, due to the effect on proteolysis such as stabilization of pro-apoptotic proteins as p53, Bax, while reducing levels of some antiapoptotic proteins such as Bcl2.

Here, we have examined the relative role of MKP1, PI3K/Akt and NF- κ B survival pathways in preventing cisplatin-induced cell death. Our data revealed that MKP1 played a key role in determining the ability of PI3K and NF- κ B inhibitors to sensitize NSCLC cells to cisplatin cytotoxicity. In cells with undetected MKP1 expression, inhibition of either PI3K or NF- κ B was sufficient to enhance cisplatin effects while in cell lines with detectable expression of MKP1 this was not observed. We then addressed whether MKP1 expression was a marker or a cause of these differential chemosensitizing effects. To this end, NSCLC cell lines were interfered for MKP1 expression with siRNA. Downmodulation of MKP1 expression resulted in a dramatic enhancement of the chemosensitizing effects of both PI3K and NF- κ B inhibitors in NSCLC. The data strongly support that MKP1 and PI3K, or MKP1 and NF- κ B, signaling pathways contribute independently to cisplatin resistance in NSCLC cells. A concerted inhibition of these pathways emerges as a novel strategy to improve cisplatin antitumor activity.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture, antibodies, and reagents

H460, H727, H1299, H23 and A549 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection, maintained in RPMI supplemented with 10% fetal-bovine serum. Antibodies used were as follows; unless indicated otherwise, these reagents were from Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA: anti-MKP1 (M18), anti-pJNK (V7391, Promega, Madison, WI), anti-JNK1 (C-17), anti-p38 (C20), anti-reI β (C19), anti-pP38 (9211S, Cell Signaling

Technology, Beverly, MA), anti- β -tubulin (T9026, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), anti-c-Jun (H16), anti-p65/relA (H286). The enhanced chemiluminescent kit was from Amersham (Amersham, UK). Cisplatin was purchased from Calbiochem. Puromycin and geneticin were from Sigma–Aldrich.

2.2. Plasmids and constructions

(–453/+80) HIV-Luc contains the NF- κ B-binding sites of the HIV promoter followed by the luciferase expression cassette [28]. Gal4-p65TAD1 was obtained from Lienhard Schmitz [30,31]. pRetroSuper was from OligoEngine.

The MKP1pRetroSuper derived vector (pRS) has been described [7]. Ampicillin-resistant colonies were selected and checked by sequencing using pRetroSuper vector sequence primers 5'ACCTCCTCGTTCGACGG-3' for direct and 5'TGTGAGGGACAGGGGAG-3' for reverse sequencing.

2.3. Transfection and analysis of gene expression

For the transient transfection assays, cell lines and derived siRNA clones were transfected with Lipofectamine-2000 (Invitrogen). The maximal total amount of DNA used was 0.5 μ g in a six-well dish. pCMVrenilla plasmid was cotransfected along with the HIV-Luc for transfection efficiency control. For stable transfections, 1 μ g of the siRNA-derived construct per million cells was transfected into 80–90% confluent dishes. Mock transfections were also carried out using Lipofectamine-2000 but no siRNA. Cells were treated with 2.5-(H727 cells) or 5 μ g/ml-(H1299 cells) of puromycin for 24–48 h and kept for selection. Stable transfection was confirmed by western blotting. Luciferase and renilla assays were performed according to the manufacturer's instructions (Promega) as described previously [30]. Transfection efficiencies were corrected by cotransfection of pCMVrenilla and by measuring renilla activity. Each assay was performed in triplicate in each experiment, and each experiment was repeated three times.

2.4. Cell extracts and western blots

Whole cell and nuclear extracts were prepared essentially as described previously [3,30]. Western blotting was done by standard methods [3].

2.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts (2 μ g of protein) of cells were incubated with a 32 P-labeled probe containing the NF- κ B-binding site [30]. The protein–DNA complexes formed were analyzed by EMSA as previously described [27]. Specific complexes were identified by incubating nuclear extracts with the corresponding antibody. In order to correct for protein each band shift we have used a probe to the transcription factor Oct-1. Specific competition was performed by incubation with 10-fold higher amount of the NF- κ B probe.

2.6. Cell viability determination

Cell viability was determined using a crystal violet staining method followed by colorimetric assay as described [3].

2.7. Proteasome activity assay

Cell lysates were prepared and the fluorogenic peptide substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr, AMC was used according with the procedures described by the 20S proteasome activity Assay kit (Chemicon, Temecula, CA). Free AMC liberated by the substrate hydrolysis was quantified for 90 min at 1-min intervals on a microtiter plate fluorometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Durham, NC, excitation 355 nm, emission 460 nm). The data were plotted as arbitrary fluorescence units and proteasome activity values (% control) were obtained.

3. Results

3.1. Activation of JNK and Akt signaling pathways in NSCLC cell lines

To understand better the cellular responses evoked by cisplatin treatment in NSCLC cells, we used five different cell lines H460, H1299, H727, H23 and A549. Cell lines H727 and H1299 were about 5-fold more resistant to cisplatin than were H460, H23 and A549 cells (data not shown). We assayed for the expression of total and phosphorylated forms of JNK, p38 and in the expression of MKP1. We chose these proteins since we have reported previously that JNK activation is involved in cisplatin-induced cell death in NSCLC [3,4], p38 has been also linked as a mediator of cisplatin cell death, and on another hand, MKP1 is able to deactivate both JNK and p38. Activation of JNK occurred in all the cell lines but, of note, with different kinetics. JNK activation kinetics was slow and late in H727 cells, basal levels were detected in H23 and H1299 cells, and a similar kinetic was detected in H460, H1299, A549 and H23 increasing at 6 h up to 24 h. Only H23 cells showed a more transient activation due to increased apoptosis at 24 h. p38 kinase was activated early in H1299 and H23 cells, but the kinetics of activation were late in H460 and almost undetected in H727 and A549 cells. H460, A549 and H727 cells expressed basal levels of MKP1, which decreased after cisplatin treatment, when activation of both JNK and p38 was detected. Low levels of MKP1 were detected in H23 cells and H1299 did not express detectable levels of MKP1 protein (Fig. 1A) or mRNA (data not shown). This observation agrees with the earlier kinetic of activation observed for p38 and JNK and with the basal levels of JNK phosphorylation observed in both cell lines.

We also checked for Akt phosphorylation, another signaling pathway that is altered frequently in NSCLC. H460, H23 and H727 cells showed increased phosphorylation of Akt in response to cisplatin (Fig. 1B). We observe a very transient activation of Akt in A549 cells. In contrast, H1299 cells exhibited an earlier and more transient kinetic of activation for pAkt than did the other cell lines, which showed even higher basal and induced levels and prolonged phosphorylation of Akt. This pattern of Akt phosphorylation agrees with the expression of PTEN in these cell lines. PTEN was highly expressed in H460 cells (Fig. 1C), almost undetectable in H1299, and low in H727, H23 and A549 cells.

3.2. Nuclear protein levels of NF- κ B family of transcription factors in NSCLC cell lines

NF- κ B is a transcription factor involved in cell growth and survival in human tumors. We first studied the nuclear levels of NF- κ B family members, both from the canonical and non-canonical NF- κ B activation pathway. We investigated the levels of two transcriptionally active members of NF- κ B, p65/relA and relB. p65/relA nuclear levels were higher in H1299, H23 and A549 cells, lower in H727 cells and undetectable in H460 cells (Fig. 2A). relB levels were very high in H1299 cells (Fig. 2A), lower in H23 and A549 cells and undetectable in H727 and H460 cells.

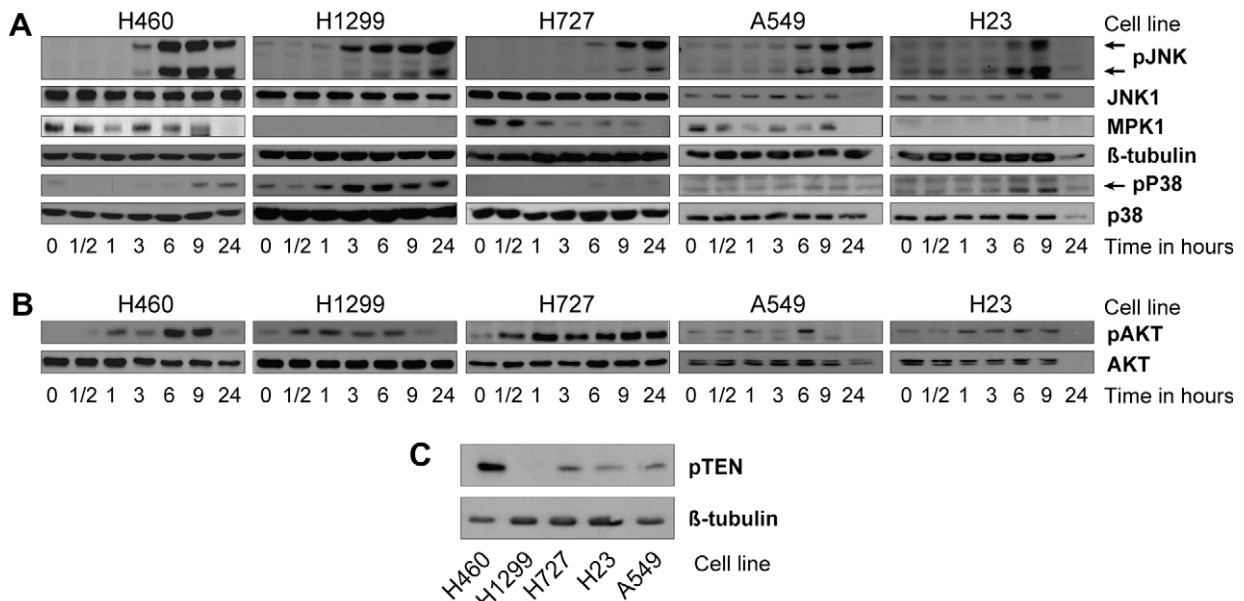


Fig. 1. Kinetics of activation of JNK, p38, and Akt in H460, H1299, H727, A549 and H23 cells treated with cisplatin. H460, H1299, H727, A549 and H23 cells were seeded and then incubated in serum-depleted medium for 16 h, after which 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cisplatin was added for the indicated times. Protein extracts of cells were obtained at each time, and 20 μg of total protein was subjected to western blotting and the membrane was hybridized with antibodies against (A) pJNK, JNK, pP38, p38, β -tubulin and MKP1 and (B) pAkt and Akt. (C) Basal levels of *PTEN* were detected in the three cell lines. The loading control of total protein was checked using an antibody against β -tubulin.

In total extracts, basal levels of both p100 and p52, two non-transcriptionally active members, increased dramatically in H1299 cells, whereas the levels p105 or p50 subunits did not differ between the cell lines (data not shown).

We further investigated the levels transcriptionally active complexes at the NF- κB by performing electrophoretic mobility assays. We have found that H1299 and H23 cells showed higher proportion of NF- κB complexes, when compared with H727 (Fig. 2B) which agrees with the results obtained above (Fig. 2A). In order to characterize which κB proteins were bound constitutively to the NF- κB sites, we use specific antibodies of p65, relB and p50 to compete binding in nuclear extracts from H1299, H23 and H727 cells. The results indicated that H1299 cell complexes comprise p65, relB and p50 (Fig. 2C) proteins while in H23 and H727 κB complexes were composed mainly by p65/p50 heterodimers. The results indicate that in NSCLC cell lines both NF- κB signaling pathways, canonical and non-canonical, contribute to NF- κB signaling.

To investigate whether levels of nuclear NF- κB proteins correlated with the magnitude of NF- κB -dependent transcription, we used the HIV-Luc reporter, which contains two κB -binding sites (Fig. 2D). Although H460 cells showed almost no basal activation of the NF- κB reporter, H23 cells showed the highest increase in basal NF- κB -dependent transcription, followed by H1299 cells, H727 and A549 cells in a decreasing order. These differences were not due to changes in transfection efficiencies, since all luciferase values were normalized to that of an internal renilla control. Different cellular stimuli can activate NF- κB transcription by mechanisms independent of its nuclear translocation [31]. These alternative mechanisms involve stimulation of the transactivation domain of both the basal and induced levels of the p65 subunit of NF- κB . Therefore, we studied whether the differences observed were dependent on the transcriptional activation of p65. To address this question, we used a plasmid encoding the Gal4–p65 fusion protein, where the sequences encoding the DNA binding domain of Gal4 have been joined with sequences encoding the TAD1 of p65 [31]. Once transfected with the Gal4-Luc reporter, this construction allowed us to determine whether the cellular signals activated in H1299, H23, A549 and H727 cell lines regulate gene expression by specifically targeting TAD1 of the p65/relA protein. The results showed that basal activation of the p65 TAD1 was higher in H727 cells (Fig. 2E) and much lower in the other cell lines. These results indicate that, in H727 cells, basal NF- κB transcriptional activity is partially related to an increase in p65 transactivation potential.

3.3. Inhibition of PI3K or NF- κB sensitize NSCLC cells expressing low MKP1 levels towards cisplatin

For combinatorial and mechanistic experiments, we chose three cell lines (H1299, H727 and H460) from our panel, due to their differential basal and cisplatin-induced expression of PI3K and NF- κB pathways and MKP1 (see Fig. 1), as well as for their good transfectability with siRNA (see below). We could not obtain MKP1-siRNA-derived viable cell lines from H23 or A549 cells. We first studied the effects of PI3K inhibition due to its involvement in the control of survival and proliferation of cancer cells [15]. We used the PI3K inhibitor LY294002 to inhibit the signaling pathway triggered by PI3K, and we checked the timing of LY294002 inhibition of phosphorylation of Akt in H1299 cells. Cells were pretreated with LY294002 for 4 h and then stimulated with either cisplatin (Fig. 3A) or epidermal growth factor (EGF) (Fig. 3B). Treatment of cells with LY294002 inhibited phosphorylation of Akt in response to both stimuli (Fig. 3A and B). We next tested whether treatment of parental cell lines with LY294002 (10 μM) influenced the cell survival in response to cisplatin treatment (Fig. 3C). LY294002-pretreated H727 and H460 cells, both expressing MKP1, showed no or very little increase in sensitivity to cisplatin. This contrasted with the data obtained in the western blots, where we detected an important activation of Akt in H727 cells, which is usually a consequence of PI3K activity (Fig. 1B). On the other hand, H1299 cells (with undetected MKP1 expression) were more sensitive to the inhibitor and the IC_{50} values showed a difference of nearly two orders of magnitude in response to cisplatin (Fig. 3C).

In addition to PI3K, activation of NF- κB may represent another mechanism responsible for de novo and inducible chemoresistance because of its antiapoptotic action [15]. Both H1299 and H727 cells showed constitutive activation of the NF- κB reporter construct (Fig. 2D and E).

We next investigated the effect of canonical NF- κB inhibition in combination with cisplatin treatment. To this end, we used Bay11-7082, which acts at the level of I κB by inhibiting its phosphorylation and consequently the translocation of p65-NF- κB to the nucleus. We first tested the effect of pretreatment with Bay11-7082 on accumulation of NF- κB complexes in the nuclei. H1299 cells were treated for 4 h and the levels of κB complexes were detected by band shift assays. Fig. 4A shows a marked decrease in the level of κB complexes in H1299 cells after treatment with Bay11-7082.

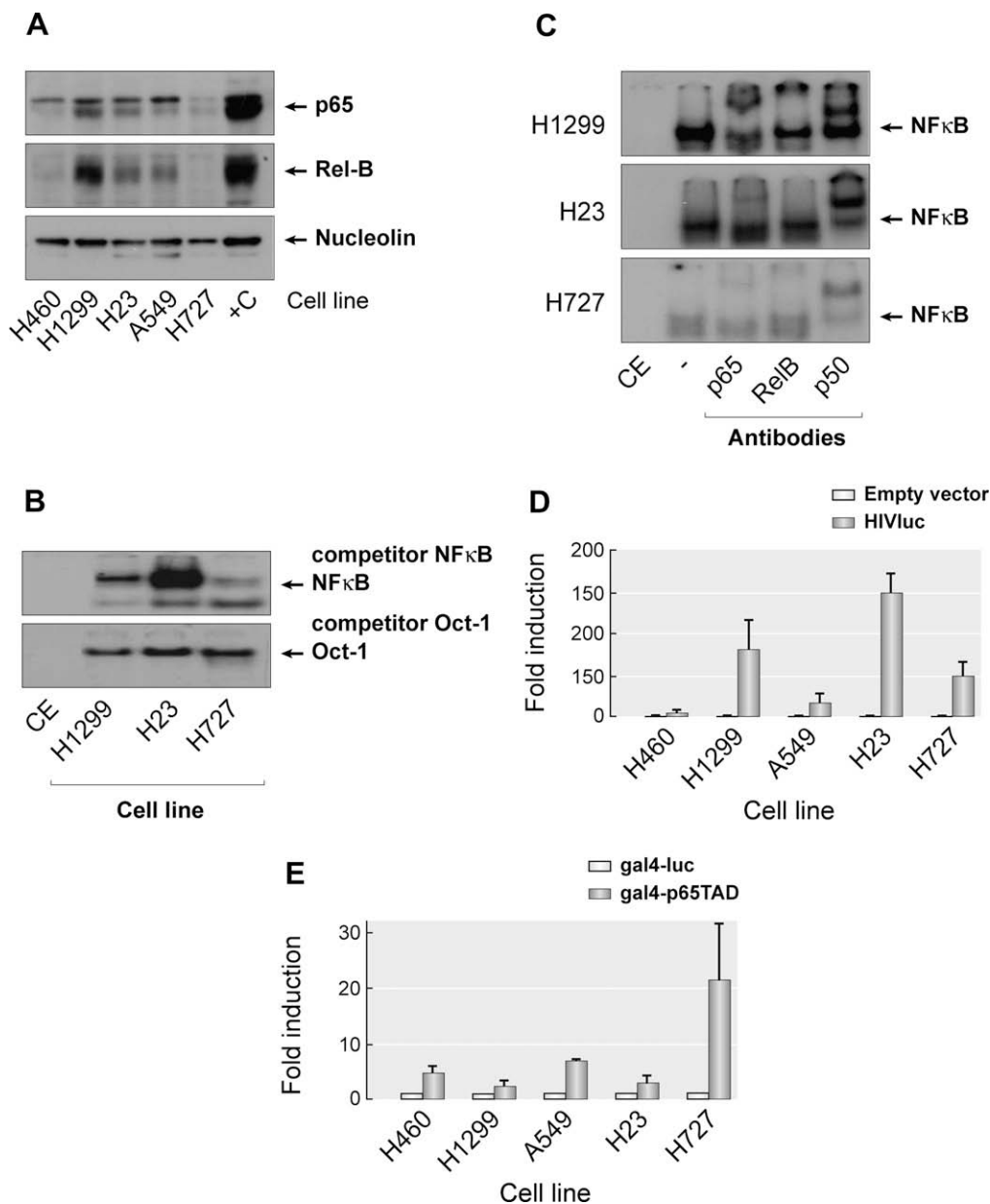


Fig. 2. Nuclear levels of NF-κB proteins in NSCLC cells. (A) H460, H1299, H727, A549 and H23 cells were seeded and incubated in serum-depleted medium for 16 h. Nuclear protein extracts of cells were obtained, and 5 μg of nuclear protein was subjected to western blotting and the membrane was hybridized with antibodies against p65/relA and relB, an antibody against nucleolin was used as the loading control for nuclear protein, control cells stimulated with TNF-α. (B) EMSA analysis of NFκB binding. Band shift assays were performed with nuclear extracts obtained in B and using 5 μg of protein. Specific competition was obtained with the NFκB cold probe (upper panel). An Oct-1 probe was used for loading control (lower panel). (C) Identification of κB complexes in H1299, H23 and H727 cells. Nuclear extracts obtained in A were subjected to EMSA assay and binding to the κB oligonucleotide was competed with specific antibodies towards, p65/relA, p50 and relB. Specific (NFκB) competitor is indicated in the figure (c). (D) NF-κB-dependent transcription in NSCLC cells. H460, H1299, H727, A549 and H23 cells were transfected by Lipofectamine either with empty vector or with 0.5 μg of (–453/–80) HIV-luc per 60-mm well. The fold increase in luciferase activity was calculated relative to the value for the empty vector-transfected cells. (E) H460, H1299, H727, A549 and H23 cells were cotransfected with a 5X-Gal-luc reporter plasmid (0.25 μg) or 5X-Gal-luc reporter plus the expression vector encoding GAL4-p65 TAD1 (0.25 μg). After 24 h, the cells were collected and the relative luciferase activity was determined as in D. Data shown in this figure represent the mean of a single experiment performed in triplicate ±SD and are representative of three or more experiments with similar results.

One set of cells was treated with Bay11-7082 (5 μM) for 4 h before adding increasing concentrations of cisplatin, and another set of non-pretreated cells was treated with cisplatin in an identical manner. In both H727 and H460 cell lines, the sensitivity to cisplatin did not increase when pretreated with Bay11-7082 (Fig. 4B). In contrast, H1299 cells were very sensitive to this inhibitor and showed a

difference of nearly two orders of magnitude in response to cisplatin (Fig. 4B). Notably, these results were very similar to what we observed when we used a PI3K inhibitor (see above) instead of Bay11-7082. Both experiments pointed to the presence of MKP1 as a limiting factor in the chemosensitizing effects of both PI3K as well as specific, canonical, NF-κB inhibitors towards cisplatin.

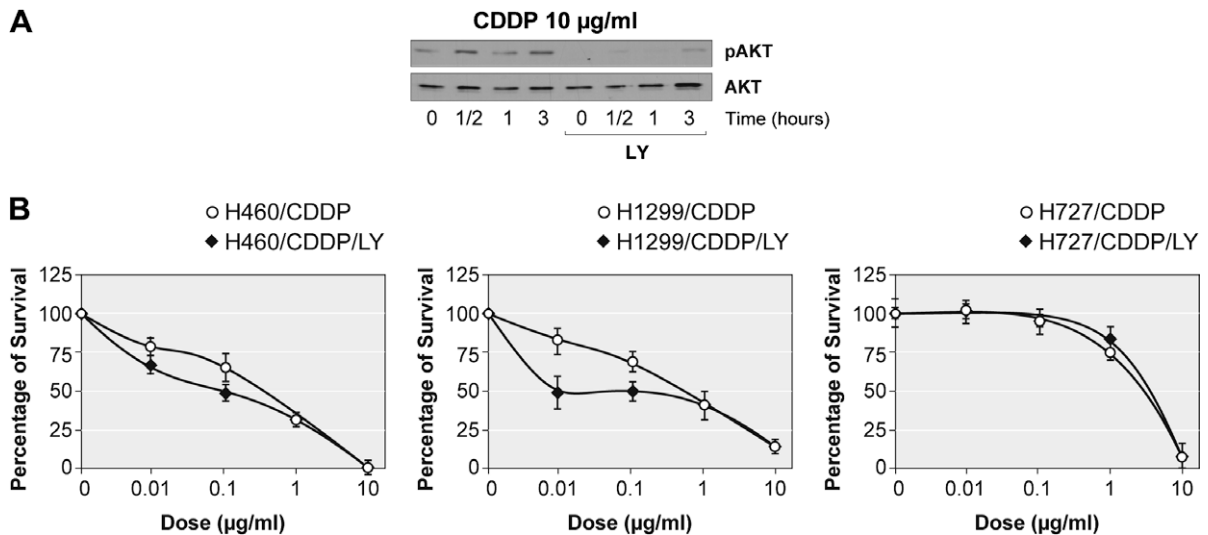


Fig. 3. Effect of pretreatment with the PI3K inhibitor LY294002 on cisplatin survival in NSCLC cells. (A) Treatment of LY294002 in H1299 cells. H1299 cells were seeded and then incubated in serum-depleted medium for 16 h. Cells were treated either with cisplatin (10 µg/ml) or EGF (20 ng/ml). The cells had been pretreated with LY294002 protein extracts of cells were obtained at each time, and 20 µg of total protein was subjected to western blotting and the membrane was hybridized with antibodies against pAkt or Akt as indicated. (B) Cell viability in response to cisplatin (at the indicated concentrations) of H460 pSuperRetro (H460), H1299 pSuperRetro (H1299), and H727 pSuperRetro (H727) cells and the effect of LY294002. When indicated (LY), cells were pretreated for 4 h with LY294002 (10 µM). Data represent the means of two experiments performed in quadruplicate.

3.4. Inhibition of MKP1 expression in NSCLC, facilitates chemosensitization of PI3K and NF-κB inhibitors to cisplatin

Since evidence obtained in our laboratory strongly suggested that expression of MKP1 in NSCLC cell lines protected against PI3K and NF-κB sensitization towards cisplatin-induced cell death (9), we generated MKP1 siRNA-derived cell lines from H1299(H1299cri) and H727(H727cri) cells. The generation and expression of MKP1 in H460MKP1-siRNA cells has been described elsewhere (H460cri) by us [9]. H1299 did not express MKP1 (Fig. 1A), but were transfected for experimental control. The expression of MKP1 protein in H727 cells was inhibited by 30% in the resulting cell line (Fig. 5A). We next studied the effect of LY294002 in MKP1-siRNA-derived cell lines. This time, we observed a dramatic increase in sensitivity to cisplatin in both H460cri and H727cri cells, which have lower MKP1 levels than their parental cells (Fig. 5B). In H1299 cells, that endogenously lack MKP1, the level of enhancement of cytotoxicity did not differ between wild-type and H1299cri cells. These results suggest that LY294002 has a direct sensitization effect in cells that express pAkt but low MKP1. In contrast, the basal expression of MKP1 is able to interference with this sensitization. The increased sensitivity to cisplatin of MKP1 siRNA-derived H460 and H727 cell lines treated with LY294002 is not due to an increase in phosphorylation of JNK (data not shown), more likely to the inhibition of PI3K survival pathway.

We next investigated the effect of Bay11-7082 pretreatment on MKP1-siRNA-derived cells (Fig. 5C). This time, we found very strong sensitization of H460cri and H727cri cells, as shown by a decrease of the IC₅₀ to <0.01 µg/ml cisplatin. The increased sensitivity to cisplatin of MKP1-siRNA derived H460 and H727 cell lines treated with Bay11-7082, is not due to an increase in phosphorylation of JNK (data not shown), more likely to the inhibition of NF-κB survival pathway, since activation of NF-κB by cisplatin is inhibited in these cells (data not shown). The IC₅₀ of H1299cri did not change considerably from the values obtained with the wild-type, implying that no further sensitization occurred. These results again indicate that expression of MKP1 in H460 and H727 cells interferes with the activity of Bay11-7082 sensitization to cisplatin. Collectively, these results indicated that downmodulation of MKP1 expression in the assayed NSCLC cell lines was necessary to allow cisplatin sensitization by PI3K or NF-κB inhibition.

3.5. p65/relA and relB are expressed in NSCLC tumor specimens and Bortezomib inhibits lung cancer cell growth

To complement the studies described above regarding NF-κB role, we assayed by IHC the expression of nuclear NF-κB proteins in NSCLC tumor samples. Previous work has described the presence of p65 (canonical pathway) in surgically resected NSCLC specimens [32,33], but there are no reports on relB expression (non-canonical pathway) in this tumor. We evaluated the expression of p65/relA and relB in sections of tumor samples from 26 patients with NSCLC (Table 1 Supl 1). Nearly 60% of the samples corresponded to squamous cell carcinomas, 30% to adenocarcinomas, and the rest to undifferentiated large-cell carcinomas. Briefly, 60% of the samples were grouped into stage I, and rest into stage II. In tumor tissues, nuclear p65/relA staining was present in 50% of samples (Fig. 6A and B and Table 2). In contrast, relB nuclear staining was observed in 20% of samples. Samples that were positive for nuclear relB expression were also positive for nuclear p65/relA expression ($p = 0.0007$). Staining for p65/relA was found in the nuclei and at a lower level in the cytoplasm. In contrast, relB was barely detectable in the cytoplasm of the p65/relA-positive samples. These results agree with the western blots of nuclear extracts of H1299, H23 and A549 cells (Fig. 2A) and show that the expression of p65/relA and relB in the nucleus was homogeneously distributed among the different subgroups of patients. On the other hand, MKP1 expression was observed in 80% of the samples and was homogeneously distributed among different tumor subtypes (Table 2). Interestingly, 93% of tumors showing nuclear p65 or relB expression also expressed MKP1, indicating that at least 53% of the samples examined resemble the situation found in H727. A small percentage of the samples showed exclusively p65 and relB expression (like H1299 cells), and the rest of the samples were positive only for MKP1 (like H460 cells).

Based on these results, an in particular on the co-expression of NF-κB members representative of both the canonical and non-canonical pathways, we then tested the effect of Bortezomib in our panel of NSCLC cell lines. Bortezomib is a non-specific NFκB inhibitor that acts by means of proteasome inhibition, and is already in the clinic for the treatment of myeloma and lymphoma patients. We first tested, by using the HIV-luciferase reporter, the effect of Bortezomib treatment on NF-κB activity induced by TNF-α. As observed in Fig. 6C, Bortezomib was able to inhibit TNF-α-NF-κB, dependent activity in a time dependent manner in both H460 and H1299 cells. Similar results were obtained with the other three

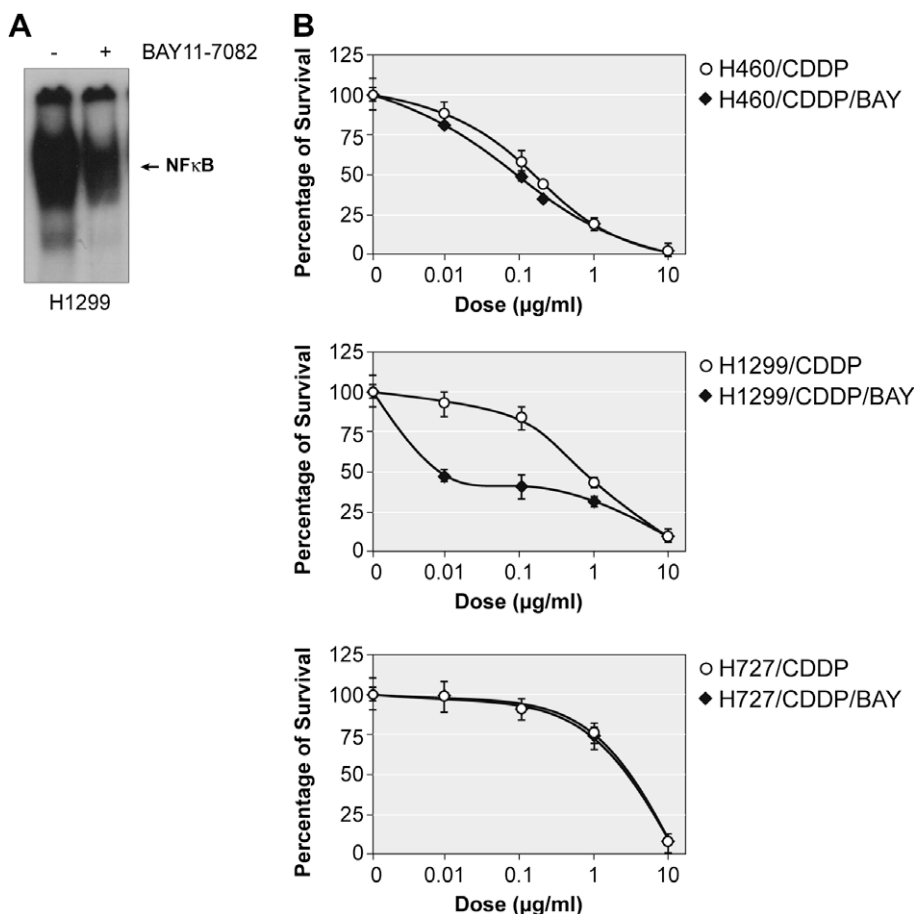


Fig. 4. Effect of the NFκB inhibitor BAY11-7082 treatment in NSCLC cells. (A) Effect of treatment with BAY11-7082 on nuclear NF-κB complexes in H1299 cells. H1299 cells were seeded and then incubated in serum-depleted medium for 16 h. Cells were pretreated with BAY11-7082 (5 μM) during 30 min. Nuclear extracts were obtained and analyzed by EMSA for NF-κB-binding activity as indicated in Materials and Methods. (B) Cell viability in response to cisplatin (at the indicated concentrations) of cell lines indicated in B and the effect of BAY11-7082 pretreatment. All cell lines were seeded in 24-well plates and cisplatin was added the following day at concentrations ranging from 0 to 10 μg/ml. When indicated (BAY), cells were pretreated for 4 h with BAY11-7082 (5 μM). After 72 h, the cells were fixed with glutaraldehyde, stained with crystal violet, and the percentage staining calculated according to standard procedures. Data represent the means of two experiments performed in quadruplicate.

cell lines (data not shown). We next treated all NSCLC cell lines with Bortezomib and found that it inhibited cell viability in most NSCLC cell lines used (Fig. 6D). Interestingly Bortezomib cytotoxic activity correlated with the basal NF-κB activity of the cells (Fig. 2D). H23 cells, with the highest basal NF-κB activity were the most sensitive, followed by H1299, A549 and H727 cells showed intermediate levels of sensitivity and also of NFκB activation. H460 cells that showed very low NF-κB activity were very resistant to Bortezomib. Bortezomib was indeed inhibiting proteasome activity, as shown in our results of proteasome proteolytic activity in NSCLC cells (data not shown). Furthermore we found that H460 cells, that were resistant to Bortezomib, when inhibiting MKP1 expression (H460cri), did not become sensitive to either Bortezomib or to the combination Bortezomib/cisplatin (data not shown) indicating that inhibition of proliferation even if was correlating with NF-κB activity on the cell lines used it was occurring by and MKP1 independent mechanism.

4. Discussion

Lung cancer is the leading cause of cancer death throughout the world and causes around 1.2 million deaths annually. The basis for this lethality is related to the late diagnosis (more than 70% of patient will be

diagnose with an un-resectable disease) and the inherited resistance of lung cancer cells to therapeutic agents. However, data from phase III studies confirm that more than 60% of NSCLC patients will not respond to any approach and responders will always progress in a few months and die from this disease within a year.

The sensitivity of cells to chemotherapeutic drug-induced apoptosis appears to be dependent on the balance between pro-apoptotic and antiapoptotic signals. We have shown previously that overexpression of MKP1 in NSCLC occurs frequently in surgical samples from stage I/II patients [9]. NSCLC cell lines constitutively expressing MKP1 are more resistant to cisplatin than are cells in which MKP1 expression has been inhibited by siRNA transfection. Other signaling pathways altered in NSCLC may also influence the cisplatin response, such as inhibitors of drug-induced apoptosis. The PI3K/Akt pathway is a critical pathway in lung cancer [18] because it is constitutively activated in NSCLC and is detected in precursor lesions in

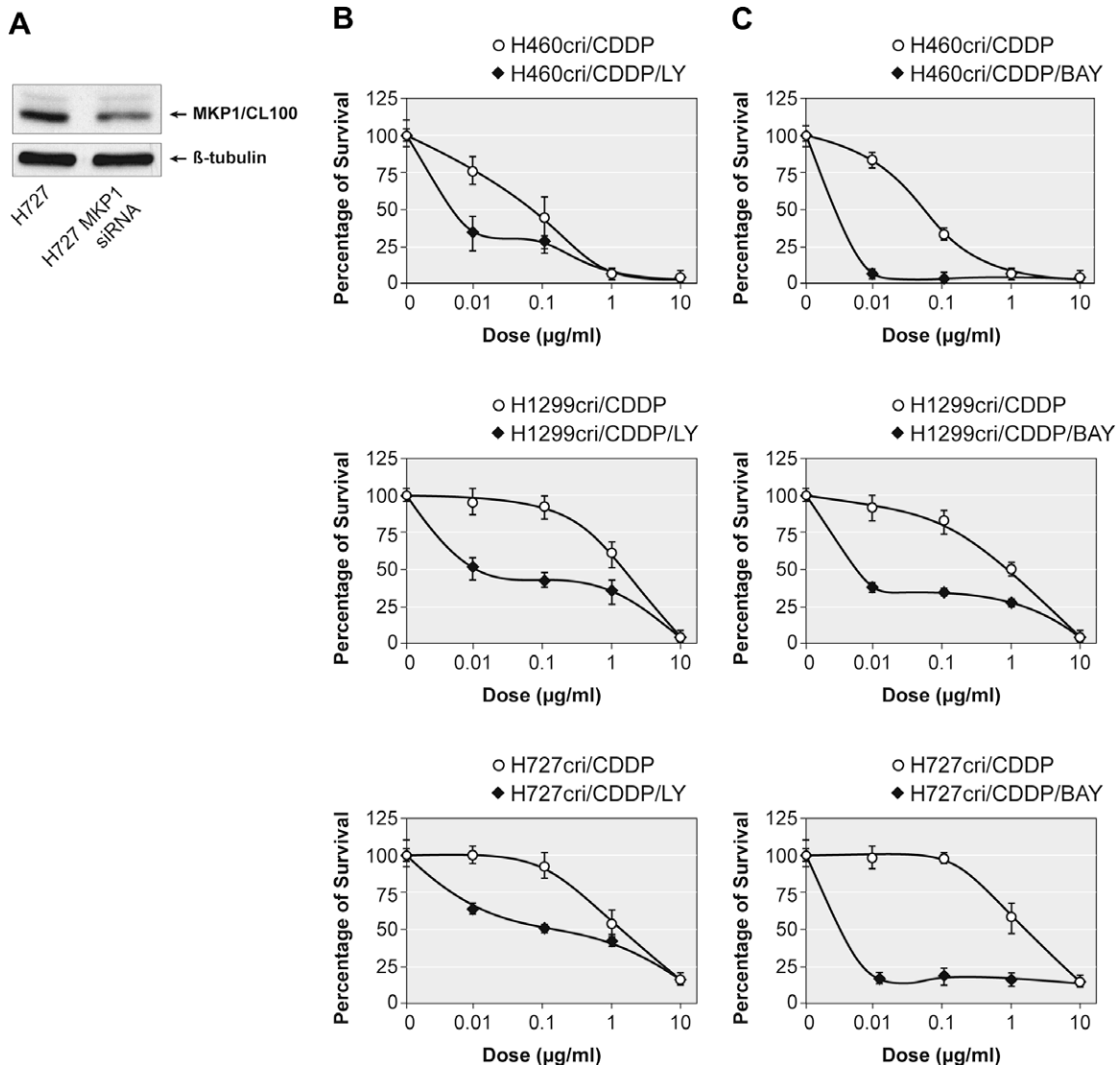


Fig. 5. Effect of pretreatment with the PI3K and NF- κ B inhibitors on cisplatin survival in MKP1siRNA-derived NSCLC cells. (A) Levels of MKP1 protein in H727-MKP1-siRNA cells. Total protein (20 μ g) of H727 cells transfected with either pSuperRetro or MKP1siRNA was separated by western blotting, and the resulting membrane was probed with specific antibody against MKP1. Antibody against β -tubulin was used to control for the amount of protein loaded. (B and C) Cell viability in response to cisplatin of H460 MKP1 siRNA (H460cri), H1299-MKP1-siRNA (H1299cri) and H727-MKP1-siRNA (H727cri) cells and effect of LY294002 (B) or BAY11-7082 (C) pretreatment. All cell lines were seeded in 24-well plates, and cisplatin was added the following day at a concentration of 0–10 μ g/ml. When indicated (BAY or LY), cells were pretreated for 4 h with LY294002 (10 μ M) or BAY11-7082 (4 μ M). After 72 h, the cells were fixed with glutaraldehyde and stained with crystal violet, and the percentage staining calculated according to standard procedures. Data represent the means of two experiments performed in quadruplicate.

lung cancer [32,33]. In contrast, PI3K activity is also stimulated by carcinogens, such as components of tobacco, and in response to chemotherapy [34]. We have shown previously that treatment of cells with cisplatin induces cell death by modulating both survival and pro-apoptotic pathways (MKP1 and NF- κ B) [27]. Activation of JNK induces AP1-mediated FasL transcription that contributes to cell death. In parallel, cisplatin also activates NF- κ B, which activates transcription of genes such as XIAP and impairs cisplatin-induced apoptosis [27].

We investigated the role of the three pathways MKP1, Akt, and NF- κ B in five different NSCLC cell lines to gain a

better perspective of the potential variety of molecular contexts in tumors and found critical differences in the behavior of these cell lines after treatment with cisplatin. Although in all cell lines stimulation with cisplatin caused activation of JNK and p38, H1299 and H23 cells exhibited a faster kinetic, probably because these cells do not express (H1299) or expressed low levels (H23) of MKP1. In contrast, both H1299 and H727 cells, which are more resistant to cisplatin, expressed a basal level of phosphorylated Akt. Akt is an antiapoptotic protein, and its constitutive activation is consistent with the response to cisplatin in both cell lines. Nuclear expression of the NF- κ B proteins, p65, and

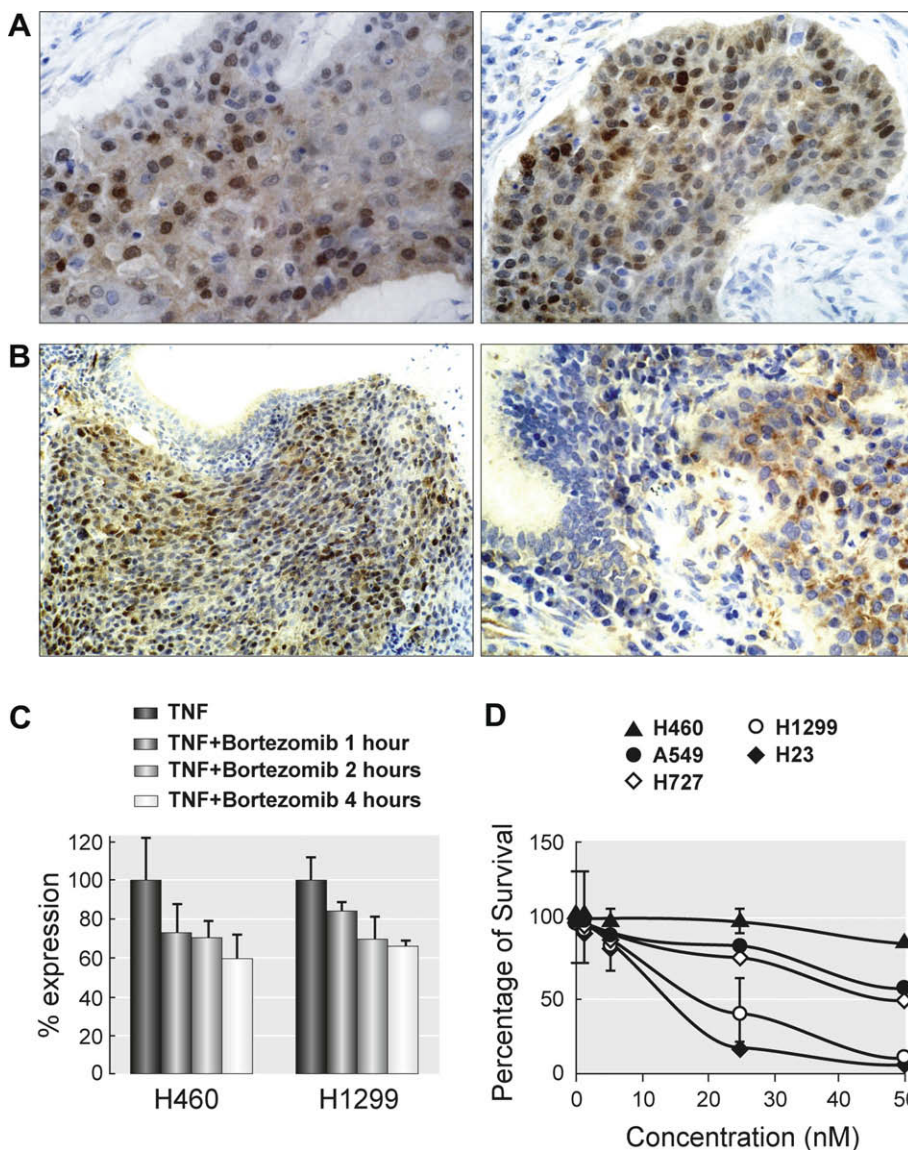


Fig. 6. Immunohistochemistry of patient tumor samples showing localization of relB and p65/relA and effect of Bortezomib treatment on NSCLC cells. (A and B) Sections of 5 μ m thickness were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks of the surgical tissues obtained from the patients. The primary antibody was incubated with the tissue slides and visualized with peroxidase-based EnVisionTM kit. The indicated samples were (A) hybridized with relB antibody and (B) hybridized with relA/p65. (C) H460 and H1299 cells were seeded in 60 mM dishes and transfected with 0.5 μ g of (–453/–80) HIV-luc. Cells were pretreated or not with Bortezomib and then with TNF- α for the indicated times. The fold increase in luciferase activity was calculated relative to the value for the cells non-treated with Bortezomib. (D) Cell viability of NSCLC cells with Bortezomib. H460, H1299, H727, A549 and H23 cells were seeded in 24-well plates and Bortezomib was added the following day at concentrations ranging from 0 to 50 nM. After 72 h, the cells were fixed with glutaraldehyde, stained with crystal violet, and the percentage staining calculated according to standard procedures. Data represent the means of two experiments performed in quadruplicate.

relB is increased in A549, H1299, H727 and H23 and low in H460 cells. The increased expression correlated with an increase in NF- κ B-dependent transcription on an HIV-reporter vector in H1299, H23, H727 and A549 cells. Interestingly, this increase in the KB dependent transcription of these proteins seems to occur in H727 and A549 cells because of transcriptional activation of p65. Although increased nuclear levels of relB were detected in H1299, H23 and A549 cells, we could not detect relB bound to KB complexes in gel retardation assays.

A relevant finding of this work was that more than one survival-signaling pathway is involved in regulating the altered response to cisplatin in NSCLC cells. We have previously described that inhibiting MKP1 expression in H460 sensitizes cells to cisplatin [9]. Treatment with cisplatin also induces activation of Akt, whose inhibition results in increased cytotoxicity, but only when MKP1 expression is inhibited. Because cisplatin also induces activation of NF- κ B [27], similar dependence on MKP1 expression was observed in cells treated with the NF- κ B inhibitor BAY11-

7082. This effect also occurred in other cell lines such as H727 cells, which expressed basal levels of MKP1. In contrast, when MKP1 was not expressed at basal levels, independent inhibition of either Akt phosphorylation or NF- κ B activity sensitized H1299 cells to cisplatin. Taken together, these results indicate that in the presence of basal levels of MKP1, this protein predominates in the regulation of the response to cisplatin responses and that this effect appears to be independent of PI3K or NF- κ B pathways. These findings suggest that MKP1 is a good target for improving the cellular response to chemotherapy. Since NF- κ B represent a survival pathway in NSCLC cells, we used another strategy to inhibit NF- κ B activity by inhibiting the proteasome activity with Bortezomib. Interestingly treatment of NSCLC with Bortezomib was cytotoxic only in those cells that harbor high NF- κ B-constitutive activation.

Analysis of surgical samples from NSCLC patients indicated that in most patients (80%) MKP1 levels are upregulated [9] and that only in a small percentage of patients (1/26) only NF- κ B (p65/relA and relB) localizes in the nuclei. p65/relA has been implicated in both tumor progression and cell resistance to chemotherapy. Inhibition of NF- κ B increases the efficacy of cisplatin in ovarian cancer models [35] and cervical cancer [36], to 5-fluorouracil in colon cancer [37], and to adjuvant therapy in breast cancer [38]. On the other hand, some compounds, such as 17AAG, synergistically potentiate TNF- α -induced lung cancer cell death by blocking NF- κ B [39]. These findings support the potential improvement in cisplatin responses by co-targeting NF- κ B or Akt and MKP1. Our results indicate that at least 25% from the surgical samples of NSCLC expressed nuclear relB or p65, an indicative of constitutive NF- κ B activity and therefore would be good candidates to benefit from Bortezomib treatment. So, it would be of interest to evaluate cisplatin activity in the adjuvant setting in patients selected by our molecular approach in order not to expose patients with scarce molecular possibilities to respond to cisplatin to an almost certain toxicity. Finally, clinical data from the unique reported phase II study where Bortezomib was administered to NSCLC patients both alone and in combination with docetaxel, evidenced a modest activity as single-agent and did not enhance docetaxel responses or time- to- progression [40]. In this regard, our molecular data support a new evaluation of Bortezomib activity in NSCLC patients selected by our molecular approach, since other studies tested this drug in molecularly inadequate patients.

In conclusion, our results showed that an activated PI3K/Akt or NF- κ B pathway was linked to a reduced sensitivity to cisplatin in NSCLC cells. Inhibition of PI3K or NF- κ B potently enhanced cisplatin cytotoxicity in cells with endogenous or genetically induced low MKP1 levels. We believe that these data add support to the concept of MKP1 as a novel target for NSCLC treatment and that assessment of MKP1 expression emerges as a biomarker for chemosensitizing strategies towards cisplatin in NSCLC.

Conflicts of interest

None declared.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Millennium Pharmaceuticals for providing Bortezomib and to Dr. Lienhard Schmitz for providing the Gal4-p65TAD1 plasmid and Javier Perez for helping with the artwork. This work was supported by Grants PI051305 (R.P.), PI081485 (R.P.), PI061513 (J.A., A.R.), PI052019 (A.R.) Grants and RETICS RD06/0020/0109 (J.A., A.R.) from the “Fondo de Investigación Sanitaria FIS/ISCIII ISCIII)” and from Fundación Mutua Madrileña. We also thank Fundació Cellex (Barcelona) for a generous donation to the Group of Molecular Therapeutics and Biomarkers in Breast Cancer, IMIM. I S-P is in receipt of career development awards from the *Ramón y Cajal* program funded by the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia*. R M-P is a recipient of Fundación Genoma Fellowship.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.canlet.2009.05.029](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.029).

References

- [1] A. Eastman, Interstrand cross-links and sequence specificity in the reaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA, *Biochemistry* 24 (1985) 27–32.
- [2] I. Sanchez-Perez, M. Martinez-Gomariz, D. Williams, S.M. Keyse, R. Perona, CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin, *Oncogene* 19 (2000) 5142–5152.
- [3] I. Sanchez-Perez, J.R. Murguía, R. Perona, Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death, *Oncogene* 16 (1998) 533–540.
- [4] I. Sanchez-Perez, R. Perona, Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin, *FEBS Lett.* 453 (1999) 151–158.
- [5] I. Vivanco, C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 489–501.
- [6] A.S. Baldwin, Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 241–246.
- [7] L.F. Lau, D. Nathans, Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells, *EMBO J.* 4 (1985) 3145–3151.
- [8] C.H. Charles, A.S. Abler, L.F. Lau, cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein, *Oncogene* 7 (1992) 187–190.
- [9] S. Chattopadhyay, R. Machado-Pinilla, C. Manguan-Garcia, et al., MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer, *Oncogene* 25 (2006) 3335–3345.
- [10] A. Toker, A.C. Newton, Cellular signaling: pivoting around PDK-1, *Cell* 103 (2000) 185–188.
- [11] M.P. Wymann, L. Pirola, Structure and function of phosphoinositide 3-kinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1436 (1998) 127–150.
- [12] A. Di Cristofano, P.P. Pandolfi, The multiple roles of PTEN in tumor suppression, *Cell* 100 (2000) 387–390.
- [13] S.R. Datta, H. Dudek, X. Tao, et al., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell* 91 (1997) 231–241.
- [14] M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, et al., Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282 (1998) 1318–1321.
- [15] K.H. Chun, J.W. Kosmider 2nd, S. Sun, et al., Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 291–302.
- [16] H.Y. Lee, H. Srinivas, D. Xia, et al., Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-4/c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23630–23638.
- [17] J. Brognard, A.S. Clark, Y. Ni, P.A. Dennis, Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and

- promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation, *Cancer Res.* 61 (2001) 3986–3997.
- [18] H.Y. Lee, S.H. Oh, Y.A. Suh, et al., Response of non-small cell lung cancer cells to the inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MAPK kinase 4/c-Jun NH₂-terminal kinase pathways: an effective therapeutic strategy for lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 6065–60674.
 - [19] C.Y. Wang, D.C. Guttridge, M.W. Mayo, A.S. Baldwin Jr., NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5923–5929.
 - [20] T.S. Finco, A.S. Baldwin, Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis, *Immunity* 3 (1995) 263–272.
 - [21] J.R. Matthews, R.T. Hay, Regulation of the DNA binding activity of NF-kappa B, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27 (1995) 865–879.
 - [22] G. Bonizzi, M. Karin, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol.* 25 (2004) 280–288.
 - [23] K. Brown, S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, U. Siebenlist, Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation, *Science* 267 (1995) 1485–1488.
 - [24] E.B. Traenckner, H.L. Pahl, T. Henkel, K.N. Schmidt, S. Wilk, P.A. Baeuerle, Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli, *EMBO J.* 14 (1995) 2876–28783.
 - [25] J. DiDonato, F. Mercurio, C. Rosette, et al., Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 1295–1304.
 - [26] E. Dejardin, N.M. Droin, M. Delhase, et al., The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways, *Immunity* 17 (2002) 525–535.
 - [27] I. Sanchez-Perez, S.A. Benitah, M. Martinez-Gomariz, J.C. Lacal, R. Perona, Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NF-kB activity and cell viability, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 2933–2945.
 - [28] Y. Devary, C. Rosette, J.A. DiDonato, M. Karin, NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal, *Science* 261 (1993) 1442–1445.
 - [29] A. Russo, M.E. Fratto, V. Bazan, V. Schiró, V. Agnese, G. Cicero, B. Vincenzi, G. Tonini, D. Santini, Targeting apoptosis in solid tumors: the role of Bortezomib from preclinical to clinical evidence, *Expert. Opin. Ther. Targets* 11 (2007) 1571–1586.
 - [30] R. Perona, S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo, J.C. Lacal, Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins, *Genes Dev.* 11 (1997) 463–475.
 - [31] M.L. Schmitz, M.A. dos Santos Silva, P.A. Baeuerle, Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 15576–15584.
 - [32] J.W. Tichelaar, Y. Zhang, J.C. leRiche, P.W. Biddinger, S. Lam, M.W. Anderson, Increased staining for phospho-Akt, p65/RELA and cIAP-2 in pre-neoplastic human bronchial biopsies, *BMC Cancer* 5 (2005) 155–159.
 - [33] J. Tsurutani, S.M. Steinberg, M. Ballas, et al., Prognostic significance of clinical factors and Akt activation in patients with bronchioloalveolar carcinoma, *Lung Cancer* 55 (2007) 115–121.
 - [34] J. Tsurutani, S.S. Castillo, J. Brognard, et al., Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1182–1195.
 - [35] S. Mabuchi, M. Ohmichi, Y. Nishio, et al., Inhibition of NFkappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 23477–23485.
 - [36] E. Dejardin, The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1161–1179.
 - [37] R. Voboril, S.N. Hochwald, J. Li, et al., Inhibition of NF-kappa B augments sensitivity to 5-fluorouracil/folinic acid in colon cancer, *J. Surg. Res.* 120 (2004) 178–188.
 - [38] C. Montagut, I. Tusquets, B. Ferrer, et al., Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients, *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006) 607–616.
 - [39] X. Wang, W. Ju, J. Renouard, J. Aden, S.A. Belinsky, Y. Lin, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor-kappaB pathway, *Cancer Res.* 66 (2006) 1089–1095.
 - [40] M.P. Fanucchi, F.V. Fossella, R. Belt, R. Natale, P. Fidias, D.P. Carbone, R. Govindan, L.E. Razez, F. Robert, M. Ribeiro, W. Akerley, K. Kelly, S.A. Limentani, J. Crawford, H.J. Reimers, R. Axelrod, O. Kashala, S. Sheng, J.H. Schiller, Randomized phase II study of Bortezomib alone and Bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 5025–5033.

Clinical Cancer Research

Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Human Breast Cancer Independently Predicts Prognosis and Is Repressed by Doxorubicin

Federico Rojo, Irene González-Navarrete, Rafael Bragado, et al.

Clin Cancer Res 2009;15:3530-3539. Published online May 5, 2009.

Updated Version

Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-08-2070](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2070)

Cited Articles

This article cites 50 articles, 27 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/10/3530.full.html#ref-list-1>

Citing Articles

This article has been cited by 2 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/10/3530.full.html#related-urls>

E-mail alerts

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Human Breast Cancer Independently Predicts Prognosis and Is Repressed by Doxorubicin

Federico Rojo,^{1,2,3,5} Irene González-Navarrete,^{1,4} Rafael Bragado,⁶ Alba Dalmases,^{1,4} Silvia Menéndez,^{1,4} Maria Cortes-Sempere,⁷ Cristina Suárez,^{2,4} Cristina Oliva,^{1,4} Sonia Servitja,^{1,3,4} Vanesa Rodríguez-Fanjul,⁷ Isabel Sánchez-Pérez,⁷ Clara Campas,^{1,4} Josep Maria Corominas,^{1,2,3,8} Ignasi Tusquets,^{1,3,4} Beatriz Bellosillo,^{1,2,8} Sergi Serrano,^{1,2,8} Rosario Perona,⁷ Ana Rovira,^{1,4} and Joan Albanell^{1,4,6,8}

Abstract Purpose: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 (MKP-1) dephosphorylates mitogen-activated protein kinase [extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and p38], mediates breast cancer chemoresistance, and is repressible by doxorubicin in breast cancer cells. We aimed to characterize doxorubicin effects on MKP-1 and phospho-MAPKs in human breast cancers and to further study the clinical relevance of MKP-1 expression in this disease.

Experimental Design: Doxorubicin effects on MKP-1, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), phospho-JNK (p-JNK), and phospho-p38 were assayed in a panel of human breast cancer cells by Western blot and in human breast cancer were assayed *ex vivo* by immunohistochemistry (*n* = 50). MKP-1 expression was also assayed in a range of normal to malignant breast lesions (*n* = 30) and in a series of patients (*n* = 96) with breast cancer and clinical follow-up.

Results: MKP-1 was expressed at low levels in normal breast and in usual ductal hyperplasia and at high levels in *in situ* carcinoma. MKP-1 was overexpressed in ~50% of infiltrating breast carcinomas. Similar to what was observed in breast cancer cell lines, *ex vivo* exposure of breast tumors to doxorubicin down-regulated MKP-1, and up-regulated p-ERK1/2 and p-JNK, in the majority of cases. However, in a proportion of tumors overexpressing MKP-1, doxorubicin did not significantly affect MKP-1 or phospho-MAPKs. With regard to patient outcome, MKP-1 overexpression was an adverse prognostic factor for relapse both by univariate (*P* < 0.001) and multivariate analysis (*P* = 0.002).

Conclusions: MKP-1 is overexpressed during the malignant transformation of the breast and independently predicts poor prognosis. Furthermore, MKP-1 is repressed by doxorubicin in many human breast cancers.

There is a need to find novel targets to improve the therapeutic options for breast cancer patients (1, 2). A recently proposed target is the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 (MKP-1; refs. 3, 4). MAPKs, the substrates of MKPs, play important roles in proliferation, stress responses, apoptosis, and immune response (3–7). There are three well-known

MAPK subfamilies: extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK), and p38 MAPK isoforms. MAPKs are activated through a cascade of sequential phosphorylation events. The phosphorylation of MAPKs on threonine and tyrosine residues by specific upstream MAPK kinases (MEKs or MKKs) leads to their activated state.

Authors' Affiliations: ¹Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar; ²Pathology Service, Hospital del Mar; ³Breast Disease Pathology Unit, Hospital del Mar; ⁴Medical Oncology Service, Hospital del Mar-IMAS, Barcelona, Spain; ⁵Pathology Service and ⁶Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz; ⁷Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM, Translational Oncology Unit, Madrid, Spain; and ⁸Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. Received 8/1/08; revised 2/16/09; accepted 2/18/09; published OnlineFirst 5/5/09. **Grant support:** Spanish Health Ministry "Fondo de Investigación Sanitaria" grants PI051305 (R. Perona), PI052019 (B. Bellosillo, A. Rovira, C. Campas, J.M. Corominas, I. Tusquets, and C. Suárez), and PI061513 (J. Albanell, A. Rovira, and S. Serrano) and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer grant 06/0020/19 (I. González-

Navarrete, A. Dalmases, S. Menéndez, J.M. Corominas, I. Tusquets, A. Rovira, and J. Albanell). B. Bellosillo and J. Albanell have been recipients of "Ayuda a la intensificación de investigación" ISCIII.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Joan Albanell, Medical Oncology Service, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain. Phone: 34-932483137; Fax: 34-932483366; E-mail: jalbanell@hospitaldelmar.cat.

© 2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2070

Translational Relevance

There is increasing evidence on a role of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) as a mediator of *de novo* or acquired breast cancer resistance in human cell lines and the search of MKP-1 inhibitors is actively pursued. Here, we provide evidence on MKP-1 biology in human breast cancer at three levels: (a) MKP-1 is overexpressed during the malignant transformation of the breast, (b) MKP-1 overexpression is linked with poor patient outcome, and (c) MKP-1 is a repressible enzyme by doxorubicin in many human breast cancers. This repression is associated with an increase in the levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH₂-terminal kinase. These results add clinical support to the concept of MKP-1 as a novel target for breast cancer therapy and justify further studies of MKP-1 as a promising prognostic marker.

Conversely, MKPs, also known as dual-specificity phosphatases, dephosphorylate MAPKs on tyrosine and threonine residues (3, 5, 8). The prototypic member of the family, MKP-1 is an inducible nuclear phosphatase able to dephosphorylate ERK, JNK, and p38. MKP-1 is induced by many of the same stimuli that activate MAPKs, including growth factors and stress (5). Furthermore, MAPKs can increase MKP-1 protein activity in two distinct ways: firstly, MKP binding to its MAPK target causes a subtype-specific enhancement of its catalytic activity (9), and secondly, by phosphorylation by ERK, which inhibits MKP-1 degradation through the ubiquitin pathway (10). This mechanism is viewed as a feedback control to attenuate MAPK signaling (4, 5, 11, 12). MKP-1 seems to play an important role in tumorigenesis (4, 13, 14) and counterbalances the cytotoxicity of various anticancer drugs (4, 14–21). In this regard, anthracyclines, alkylating agents, taxanes, cisplatin, or proteasome inhibitors induce apoptosis in part by activation of the JNK pathway (15, 16). Notably, high levels of MKP-1 may dephosphorylate JNK and therefore limit the cytotoxicity of these agents (14, 16, 17, 19–24). Conversely, down-modulation of MKP-1 might be proapoptotic by facilitating a persistent JNK phosphorylation (4, 17).

Several reports suggest MKP-1 as a potential target in breast cancer. In breast cancer cells, MKP-1 was a significant mediator of chemoresistance to anthracyclines, alkylating agents, and taxanes (15, 18, 19). Proteasome inhibitors induce MKP-1 and this induction played an antiapoptotic role (16, 20–23). Dexamethasone also induced MKP-1 and limited paclitaxel cytotoxicity (18, 19). In contrast, anthracyclines decrease expression of MKP-1 (15, 24). This repression is involved in the potentiation of the cytotoxicity of alkylating agents by anthracyclines (15). Aplidin also down-modulates MKP-1 (25). Complementing preclinical data, MKP-1 is overexpressed in human breast cancers (26, 27). These observations justify an interest in MKP-1 inhibitors for cancer therapy (3, 4, 19, 28, 29).

Here, we aimed to further characterize MKP-1 and phospho-MAPK regulation by doxorubicin in breast cancer cells and in an *ex vivo* model (30, 31). We also analyzed the

expression of MKP-1 in breast malignant transformation and in breast cancer patients with clinical follow-up.

Materials and Methods

Reagents, antibodies, and cells. Doxorubicin and Ro-31-8220 (both from Calbiochem; ref. 32) were purchased for use. Doxorubicin was freshly dissolved in water and Ro-31-8220 was dissolved in DMSO at stock concentrations of 10 mmol/L. Elite avidin-biotin complex method kit was from Vector Laboratories. Enhanced chemiluminescence detection kit was from Amersham Pharmacia Biotech. All tissue culture materials were from Life Technologies. The following antibodies were used: anti-phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2; Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-ERK1/2, anti-JNK, anti-p38 MAPK, and anti-phospho-p38 (p-p38) MAPK (all from Cell Signaling Technology). Anti-phospho-JNK (p-JNK; Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) from Promega and Cell Signaling Technology was used for immunohistochemical and Western blot analysis, respectively. To detect MKP-1, two antibodies were used: one for Western blot and one for immunohistochemical assays. Antibodies to detect expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 (HerceptTest) were purchased from Dako. HER2 amplification was assayed by HER2 fluorescence *in situ* hybridization pharmDx (Dako). The human breast cancer cell lines BT-474, SK-BR3, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-231, and MCF-7 (from the American Type Culture Collection) were maintained as previously reported (9).

Real-time quantitative reverse transcription-PCR. Specific PCR primer combinations and fluorogenic probes (5'-FAM, 3'-TAMRA) for the target MKP-1 mRNA and housekeeping RNA (endogenous control, 18S, β -actin, and RPLPO) were purchased from Applied Biosystems. Total RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed to cDNA using SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen). cDNAs were combined with primers and probes specific for each gene of interest along with predeveloped Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) for the following genes: MKP-1 (Hs-00610256-g1), human β -actin (Hs99999903_m1), human 18S (Hs99999901_s1), and human RPLPO (large ribosomal protein PO; Hs99999902_m1). The PCR protocol was 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. Negative controls were included and yielded no products. Real-time PCR analysis was carried out on an ABI-7500HT. C_t values were determined using SDS v2.2 software (Applied Biosystems) and compared using the C_t method.

Western blot analysis. Western blot analysis in cultured cells was done following as previously reported (20). Briefly, cells were washed in PBS and scraped, and whole-cell lysates were prepared. Frozen breast tumor samples were analyzed by Western blot, also as described previously (33).

Cell viability assay in vitro. Cells were seeded into six-well plates at 3×10^5 per well and allowed to adhere overnight. Cells were then treated as indicated in Results. The dishes were incubated for 21 h before trypsinization and counting using trypan blue and/or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay (9).

Patient data and tissue specimens for clinicopathologic analysis. The study was approved by the ethics committee of the hospital and conducted following institutional guidelines. For clinicopathologic correlations and outcome analysis, retrospective samples were needed. To this end, formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples obtained from surgical specimens from patients with biopsy-proven breast cancer were retrieved. Normal breast tissues, hyperplastic lesions, and *in situ* carcinomas from the same specimens were also assessed. In addition, selected paired formalin-fixed paraffin-embedded and frozen samples were obtained. Tumor-node-metastasis (TNM) staging was classified using the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer (34). Histologic grades were defined according to Scarff-Bloom-Richardson modified by Elston criteria (35). Estrogen and progesterone receptors and HER2 status were determined by immunohistochemistry

or fluorescence *in situ* hybridization (36). Clinical data and follow-up were obtained from review of patient's medical records. Disease relapse was considered as any primary, regional, or distant recurrence, as well as the appearance of a secondary tumor.

A tissue microarray was also constructed. Three tissue cores (1-mm diameter) were obtained from each specimen. In addition, 30 complete sections were assayed for same markers to correlate with observed tissue microarray expression. The tissue cores were precisely arrayed into a new paraffin block guided by a defined x-y position using a tissue microarray workstation (T1000; Chemicon) as reported in the literature (37).

Exposure of human breast cancers to doxorubicin *ex vivo*. In addition to retrospective formalin-fixed paraffin-embedded specimens, fresh breast cancer specimens were obtained to add *ex vivo* doxorubicin and assess its molecular effects (30, 31). Tissue slices, which were not needed for diagnostic purposes, from primary breast tumors larger than

1.5 cm were obtained from surgical specimens of patients newly diagnosed with invasive breast cancer. One slide (control sample) was put into culture medium, and a second slice (treated sample) was put on the same culture medium plus doxorubicin at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (38). Incubation was done in 24-well plates at 37°C in a constant atmosphere of 5% CO_2 for 24 h. At 24 h, specimens were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 16 h and embedded in paraffin under vacuum conditions. A full report of this method will be reported separately. Specimens were then assayed by immunohistochemistry.

Immunohistochemistry. Immunostaining was done using 3- μm tissue sections, placed on plus charged glass slides. After deparaffinization in xylene and graded alcohols, heat antigen retrieval was done in buffered solutions: pH 9 EDTA-based buffer (Dako) was used to detect MKP-1, JNK, and p-JNK; pH 8 citrate-based buffer (Ventana) was used to detect ERK1/2, p-ERK1/2, p-p38, and p38. Endogenous peroxidase was blocked by immersing the sections in 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides

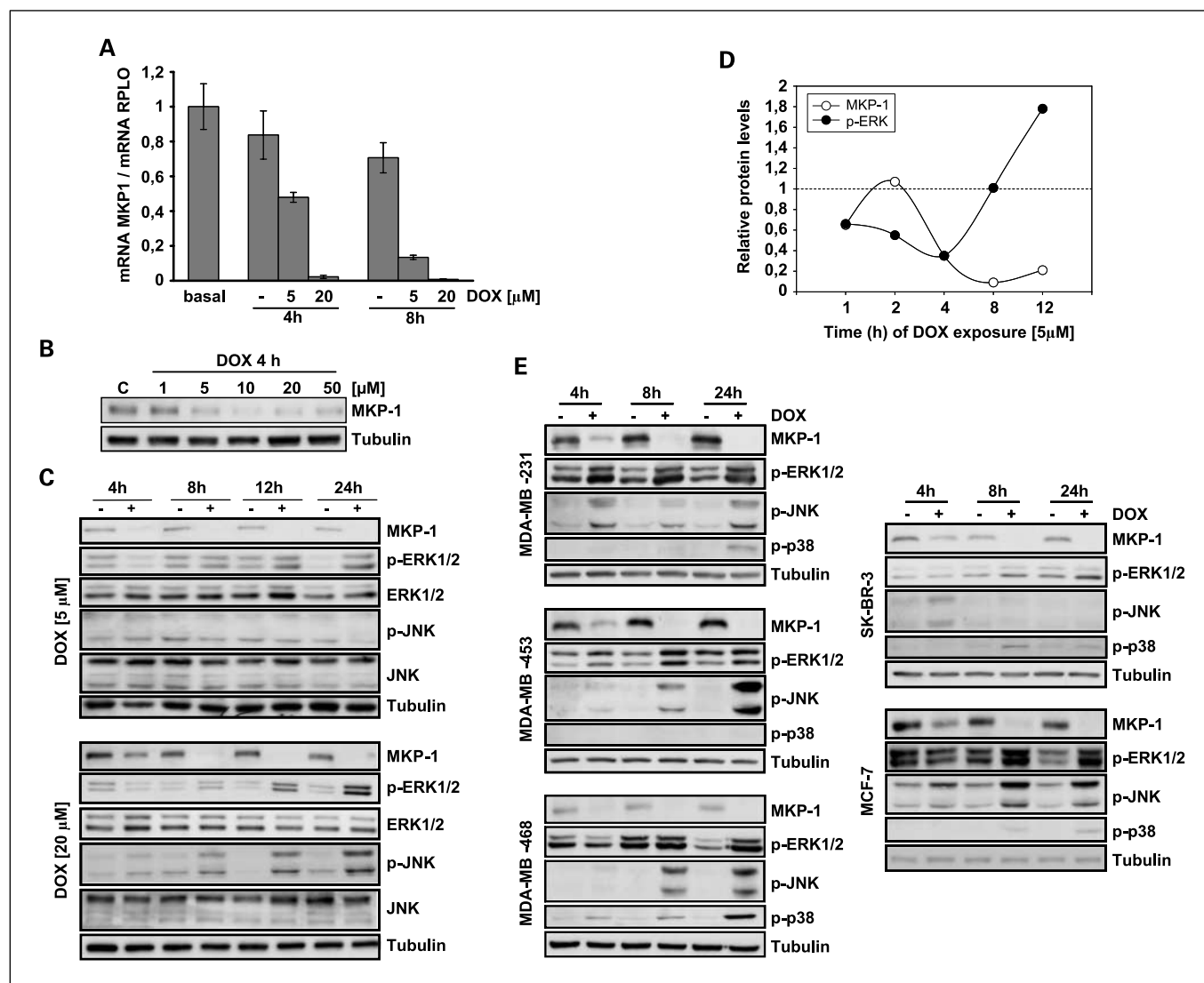


Fig. 1. Doxorubicin (DOX) effects on MKP-1 and phospho-MAPK expression in BT-474 breast cancer cells. **A**, levels of MKP-1 mRNA after doxorubicin exposure, measured by quantitative multiplex real-time reverse transcription-PCR. cDNA was synthesized from RNA samples from control- and doxorubicin-exposed cells. MKP-1 expression values are relative to the levels of a control RNA (RPLPO). Similar results were obtained with β -actin and 18S RNA. **B**, levels of MKP-1 protein in BT-474 cells exposed to increasing concentrations of doxorubicin, as assayed by Western blot. Tubulin was used as loading control. **C**, time course effects of doxorubicin (5 and 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) on MKP-1 and total and phosphorylated protein levels of MAPKs (ERK1/2 and JNK), as assayed by Western blot. No effects on p-p38 were seen (data not shown). Tubulin was used as loading control. **D**, graphic representation of a densitometric analysis of MKP-1 and p-ERK1/2 protein levels. **E**, time course effects of doxorubicin on MKP-1 and phospho-MAPKs (ERK1/2, JNK, and p38) in a panel of breast cancer cell lines, as assayed by Western blot. Tubulin was used as loading control.

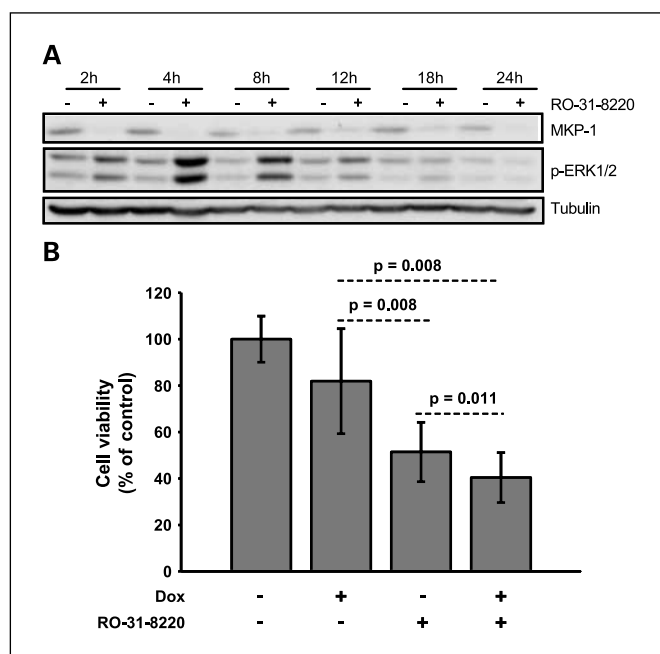


Fig. 2. A, time course of Ro-31-8220 (a nonspecific MKP-1 inhibitor) 3 h before treatment followed by a washout on MKP-1 and p-ERK1/2 in BT-474 cells, as assayed by Western blot. Please note that at 24 h the effects on p-ERK1/2 are reversed. B, effect of Ro-31-8220 before treatment on cell viability after 48 h of doxorubicin treatment, as assayed by manual trypan blue exclusion method.

were washed for 5 min with TBS solution containing Tween 20 at pH 7.6 and incubated with the primary antibodies for 60 min at room temperature followed by incubation with the appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated EnVision polymer (Dako) or peroxidase-conjugated OmniMap multimer (Ventana) to detect antigen-antibody complexes. Sections were then visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen for 5 min and counterstained with hematoxylin. All immunohistochemical stainings were done in Dako Link or Discovery XT platform and the same sections incubated with nonimmunized serum were used as negative controls. As positive control, sections of a breast human tumor with known marker expression were stained. In addition to human specimens, tissues (kidney and liver) for validation of MKP-1 immunohistochemical assay were obtained from wild-type and MKP-1 gene knockout mice (39), generously provided by Bristol-Myers Squibb Co., and processed in the same way.

Expression of markers was assessed in a blinded fashion by two investigators. For MKP-1 and MAPKs (ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK, p38, and p-p38), nuclear staining was required for considering a cell as positive. As we previously reported for phosphorylated forms of kinases, a tumor was scored as positive for a given phosphorylated protein when any percentage of tumor cells was stained (33, 40). In addition, a semiquantitative histoscore (Hscore) was calculated. The Hscore was determined by estimation of the percentage of tumor cells positively stained with low, medium, or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The formula used was $Hscore = (low\%) \times 1 + (medium\%) \times 2 + (high\%) \times 3$, and the results ranged from 0 to 300.

Statistics. Statistical analysis was carried out with Statistical Package for the Social Sciences version 13.0 (SPSS, Inc.). To analyze correlations between MKP-1 expression and clinicopathologic variables, we used the χ^2 test (Fisher's exact test) or Mann-Whitney test. A paired *t* test was used to compare molecular marker scores (immunohistochemistry) between control-treated and *ex vivo*-treated breast cancers. Effects of doxorubicin in breast specimens *ex vivo* were also expressed by means of unsupervised hierarchical clustering using the agglomeration rule

average linkage that placed cases and marker results next to each other if they were most similar in their immunohistochemical profiles (41, 42). Disease recurrence was analyzed by the Kaplan-Meier method. Curves were compared by the log-rank test. Multivariate analysis, including continuous quantitative and qualitative clinicopathologic parameters, was done using the Cox proportional hazards model. All the statistical tests were conducted at the two-sided 0.05 level of significance.

Results

Doxorubicin affects MKP-1 and phospho-MAPK in breast cancer cells. We first assessed doxorubicin effects in BT-474 cells. As assayed by MTS at 48 hours, doxorubicin IC_{25} was $\sim 5 \mu\text{mol/L}$, IC_{50} was $\sim 20 \mu\text{mol/L}$, and IC_{75} was $\sim 50 \mu\text{mol/L}$ in BT-474 (data not shown). A concentration- and time-dependent reduction of MKP-1 transcripts was observed on doxorubicin exposure, as assayed by reverse transcription-PCR (Fig. 1A). MKP-1 protein levels also decreased, with an evident effect at doxorubicin concentrations $\geq 5 \mu\text{mol/L}$ (Fig. 1B). MKP-1 protein down-regulation was observed at 4 hours (no effects were detected at earlier time points; data not shown) and was maximal at 8 hours (Fig. 1C). This inhibition was maintained at 24 hours, the latest time point tested. The decrease in MKP-1 preceded an increase in phosphorylated forms of MAPK family members. p-ERK1/2 expression increased in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1C). Induction of p-JNK was observed at doxorubicin concentrations of $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ (Fig. 1C, bottom, and experiments at $50 \mu\text{mol/L}$ not shown). p-p38 was undetected in BT-474 cells in all the conditions tested (data not shown). No evident changes were observed in total ERK1/2, JNK, and p38 proteins. A subtle reduction in p-ERK1/2 levels was observed at early time points (1-4 hours; Fig. 1D), which may decrease MKP-1 protein stability and perhaps contribute to MKP-1 down-modulation (10, 43). These kinetic effects were also observed at higher concentrations (data not shown). We next assayed five additional breast cancer cell lines (SK-BR3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-453, and MCF-7). In all of them, MKP-1 was down-modulated by doxorubicin and p-ERK1/2 and p-JNK were induced (Fig. 1E), as observed in BT-474 cells. In four of these cell lines, p-p38 was induced by doxorubicin (Fig. 1E).

We then combined doxorubicin with Ro-31-8220, an agent originally synthesized as a protein kinase C inhibitor, which reduces MKP-1 expression (32). A short exposure to Ro-31-8220 (3 hours followed by a washout) markedly reduced MKP-1 and induced p-JNK and p-ERK1/2. p-ERK1/2 levels returned to baseline at 24 hours (Fig. 2A). A combined treatment of doxorubicin and Ro-31-8220 resulted in a modest, but significant, additional reduction of cell viability compared with each agent used alone (Fig. 2B).

Validation of MKP-1 immunohistochemical assay and pattern of expression in normal and pathologic breast lesions. We tested the sensitivity and specificity of several anti-MKP-1 commercially available antibodies by immunocytochemistry (data not shown) and immunohistochemistry. A polyclonal anti-MKP-1 antibody was chosen based on results on tissues from wild-type and knockout MKP-1 mice (data not shown; ref. 39) as well as results in human tumor samples. Preabsorption with a specific antigen peptide resulted in a negative staining (data not shown). In addition, frozen human tumor samples assayed

by Western blot had expression levels that corresponded closely to the levels observed by immunohistochemistry (data not shown).

We then assayed 30 complete tissue sections that included histologic normal breast ($n = 30$) as well as hyperplastic ($n = 11$), *in situ* ($n = 18$), and infiltrating ($n = 30$) malignancies (Fig. 3A). Histologically normal breast ductal and lobular epithelial cells exhibited diffuse and weak MKP-1 staining in the nuclei. In myoepithelial cells, MKP-1 was undetected and a low level of MKP-1 expression was seen in fibroblasts and endothelial cells. In usual ductal hyperplasia,

the expression was similar to normal breast epithelium. All cases of benign breast tissue (normal and hyperplasia) had a MKP-1 Hscore <100 . This Hscore value was selected to define the threshold of MKP-1 overexpression (Fig. 3B). In contrast, in all *in situ* carcinomas, MKP-1 was overexpressed (Fig. 3A and B). In infiltrating carcinoma, MKP-1 was overexpressed in up to 50% (Fig. 3A and B). In some specimens that had both *in situ* and infiltrating carcinoma, there was overexpression of MKP-1 in the *in situ* carcinoma, whereas it was not overexpressed in the infiltrating areas. Similar results in MKP-1 staining were observed in tissue microarray

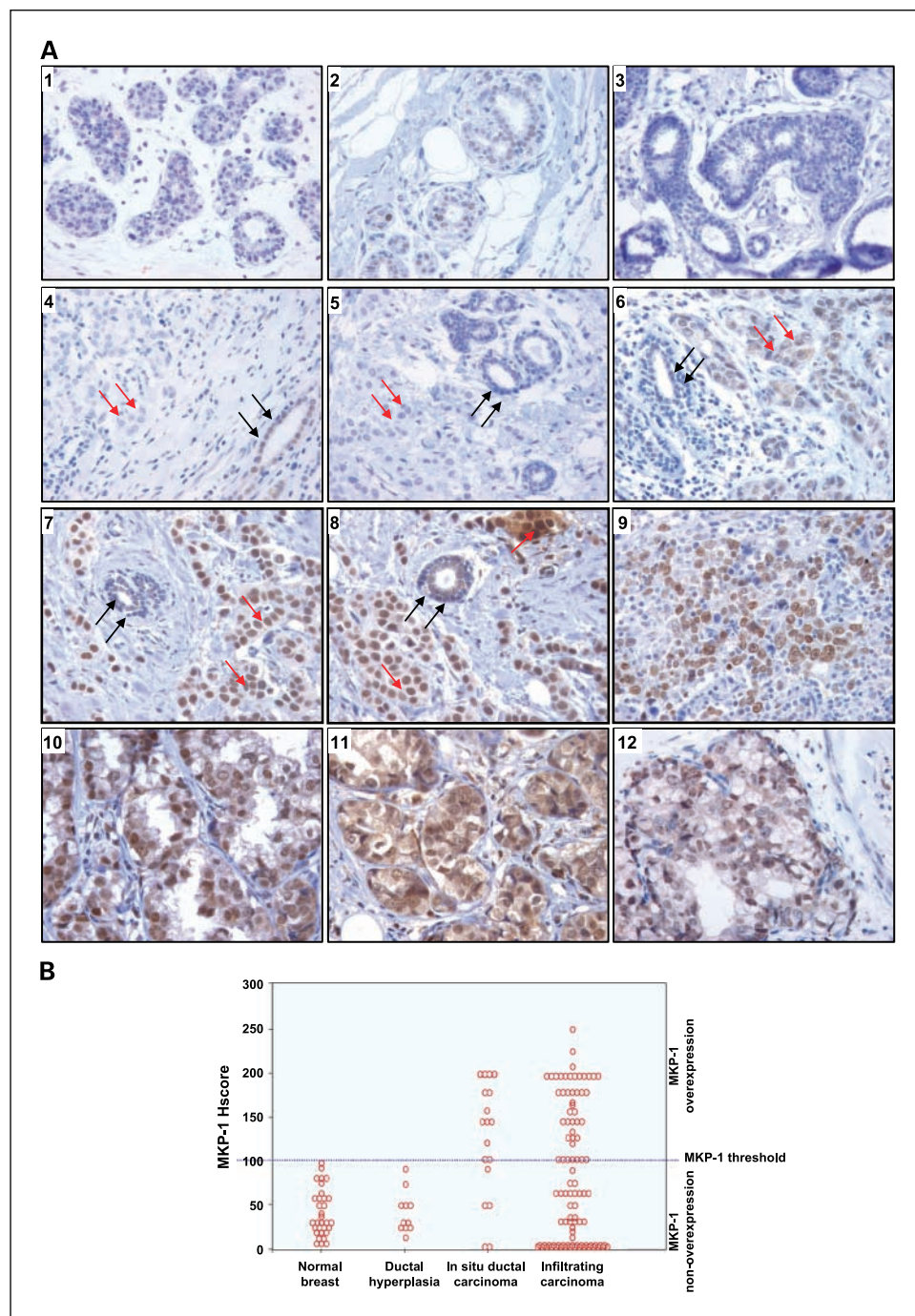
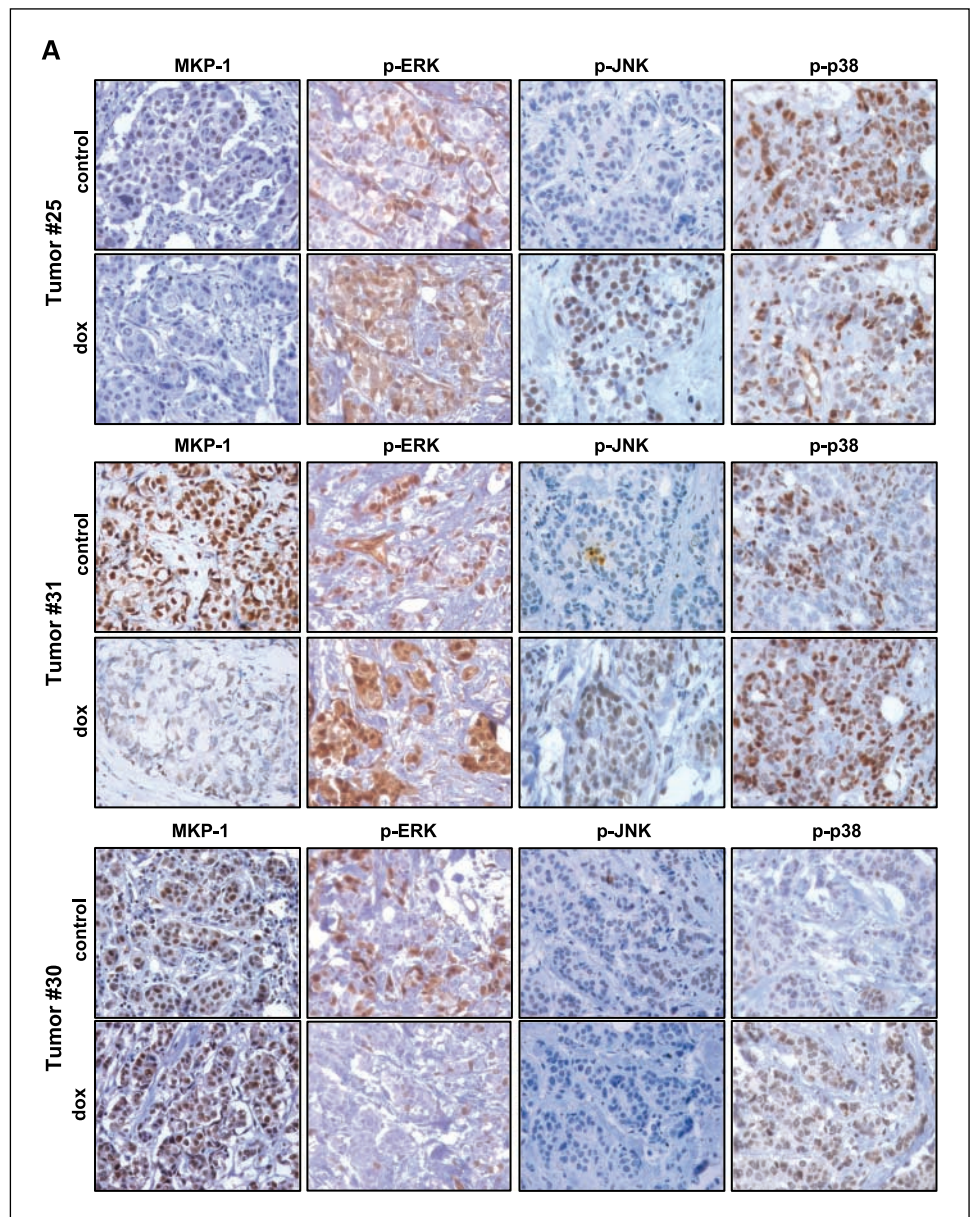


Fig. 3. A, representative pictures showing a representative range of MKP-1 expression levels observed by immunohistochemistry in human breast tissues. Histologically normal epithelial cells (1 and 2), as well as usual ductal hyperplasia (3), exhibited weak and diffuse nuclear MKP-1 staining. In infiltrating carcinoma cells, there was a wide range of expression levels, from undetected/low (4 and 5) to increasingly high MKP-1 staining (4-11). In pictures 4 to 8, infiltrating carcinoma areas are pointed by red arrows and adjacent histologically normal breast by black arrows. In pictures 9 to 11, only infiltrating carcinoma areas are shown. Picture 12 shows an *in situ* carcinoma with high MKP-1 expression. B, scatter plot by categories, displaying the levels of MKP-1 expression (Hscore) in normal breast, ductal hyperplasia, *in situ* ductal carcinoma, and infiltrating carcinoma.

Fig. 4. Effects of doxorubicin, added *ex vivo* to fresh human breast cancer sections, on MKP-1 and phospho-MAPKs, as assayed by immunohistochemistry. A, three representative examples are shown. In tumor 25, doxorubicin resulted in an almost complete loss of detectable MKP-1 expression. p-ERK1/2 and p-JNK expression increased, whereas p-p38 expression was reduced by doxorubicin. In tumor 31, doxorubicin down-modulated MKP-1. p-ERK1/2, p-JNK, and p-p38 were up-regulated. In tumor 30, MKP-1 expression was slightly increased on doxorubicin exposure. p-ERK1/2 and p-JNK were down-regulated and p-p38 was up-regulated.



cores compared with the corresponding full tissue sections (data not shown).

Doxorubicin represses MKP-1 expression in a large subset of human breast cancers. Doxorubicin effects, as a single agent, on MKP-1 and phospho-MAPKs were assayed *ex vivo* in a series of 50 fresh breast cancer specimens under controlled experimental conditions (Fig. 4). In the whole series, doxorubicin induced a significant decrease in MKP-1 [mean Hscore MKP-1, 117 ± 64 (SD) in control versus 72 ± 104 in treated specimens; $P < 0.001$]. p-JNK and p-ERK1/2 expression increased significantly by doxorubicin (Hscore p-ERK1/2, 49 ± 47 in control versus 87 ± 65 in treated specimens; $P < 0.001$; Hscore p-JNK, 72 ± 50 in control versus 126 ± 82 in treated specimens; $P < 0.001$). p-p38 expression was numerically higher in doxorubicin-treated samples, but differences were not statistically significant ($P = 0.29$). Overall, this pattern (Fig. 4B and C) resembled the one observed in breast cancer cell lines (Fig. 1).

Effects, however, were not uniform; MKP-1 levels decreased on doxorubicin exposure in 39 specimens, whereas in the remaining 11 specimens the levels slightly increased (Fig. 4). Only in tumors that down-modulated MKP-1 levels there was a significant increase in p-ERK1/2 ($P < 0.001$) and p-JNK ($P < 0.001$). We then explored whether MKP-1 baseline levels might be linked to the ability of doxorubicin to down-regulate this protein. In the 27 tumors nonoverexpressing MKP-1, doxorubicin further down-modulated MKP-1 (MKP-1 Hscore, 69 ± 21 in control versus 13 ± 14 in treated specimens; $P = 0.03$). In this subset, a significant up-regulation of p-ERK1/2 and p-JNK was observed (p-ERK1/2 Hscore, 38 ± 44 in control versus 96 ± 71 in treated specimens; $P < 0.001$; p-JNK Hscore, 58 ± 44 in control versus 150 ± 65 in treated specimens; $P < 0.001$). In contrast, in the series of 23 tumors overexpressing MKP-1, doxorubicin did not significantly change MKP-1 expression ($P = 0.24$) and did not

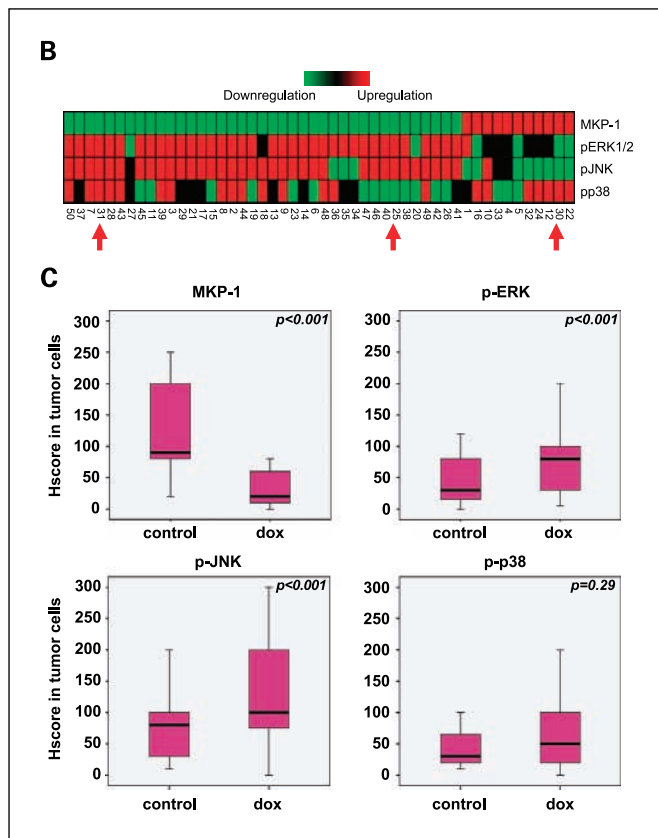


Fig. 4. Continued. B, hierarchical cluster analysis (41, 42) of doxorubicin effects on MKP-1 and phospho-MAPKs in a total of 50 human breast cancers. Each column represents an effect on expression of the paired control- and doxorubicin-treated samples, and each row, a single immunohistochemical marker, including MKP-1, p-ERK1/2, p-JNK, and p-p38. Down-regulation of expression is displayed in green, up-regulation in red, and no effect in black. Red arrows point the breast tumors displayed in A. C, box plot graphs indicating the immunohistochemical results for MKP-1 and phospho-MAPKs in control- and doxorubicin-treated conditions from *ex vivo* human breast cancers in the entire series ($n = 50$). The horizontal bar indicates median Hscore, the box represents the interquartile range, and the whiskers above and below the box show the minimum and maximum within a category. A P value for each marker is shown.

significantly affect p-ERK1/2 ($P = 0.23$), p-JNK ($P = 0.72$), or p-p38 ($P = 0.32$).

Expression of MKP-1, phospho-MAPKs, and clinicopathologic breast cancer features. Tumor specimens from paraffin-embedded blocks, with enough available tissue for the studies, were retrospectively selected from consecutive newly diagnosed breast cancer patients that had the following criteria: infiltrating ductal or lobulillar carcinomas, nonmetastatic disease at diagnosis, diagnosed between 1998 and 2000, and available clinical follow-up. A total of 96 patients with this criteria were selected (Table 1). There were 78 ductal and 18 lobulillar infiltrating carcinomas. Stage was I in 42 patients, II in 28 patients, and III in 20 patients (unknown in 6). Additional clinicopathologic characteristics are shown in Table 1. All patients had surgical treatment. Forty-four patients received systemic treatment (chemotherapy, antihormonal therapy, or both) according to our clinical guidelines (patients were not part of any clinical trial). Patients were followed at the medical oncology department (median follow-up, 69 months; range, 9-128). A total of 18 patients had a relapse.

Forty-three (45%) specimens overexpressed MKP-1 and 53 (55%) were nonoverexpressors (Fig. 3B). Mean MKP-1 Hscore was $85.3 (\pm 79.5 \text{ SD})$. The following characteristics were numerically more frequent in tumors with MKP-1 overexpression: lobular infiltrating carcinoma, grade III, negative estrogen receptors, negative progesterone receptors, HER2 overexpression/amplification, large primary tumors, lymph node metastasis, and advanced TNM stage. However, none of these characteristics was significantly correlated with MKP-1 overexpression (Table 1). Twenty-four of 44 (54%) patients that received systemic treatment had MKP-1-overexpressing tumors, whereas in the 52 that did not receive adjuvant treatment, 17 (33%) had MKP-1 overexpression ($P = 0.16$). The more frequent use of adjuvant treatment in patients with MKP-1 overexpression may reflect that this was more common (albeit without reaching statistical significance) in patients with adverse prognostic features (Table 1). We also assessed the interplay between MKP-1 and phospho-MAPKs. All infiltrating breast cancers expressed some degree of p-ERK1/2, p-JNK, and p-p38. The mean Hscores and SD for these MAPKs were as follows: p-ERK1/2, 58.3 ± 58.7 ; p-JNK, 32.7 ± 47.7 ; and p-p38, 120.6 ± 76.7 . Breast cancers overexpressing MKP-1 had slightly higher Hscore values of p-ERK1/2 (61.4 ± 54.2 in MKP-1 overexpressors versus 55.8 ± 62.4 in nonoverexpressors; $P = 0.020$) but had lower Hscore values of p-p38 (95.5 ± 71.6 versus 140.9 ± 75.4 ; $P = 0.005$). There were no significant differences in p-JNK (29.6 ± 29.7 versus 35.2 ± 41.6 ; $P = 0.98$) with regard to MKP-1 expression.

Overexpression of MKP-1 and breast cancer relapse. Disease-free survival analysis showed a higher risk of relapse in patients with MKP-1 overexpression (Fig. 5; $P < 0.001$, log-rank test). Kaplan-Meier survival curves for relapse and log-rank test comparisons also showed that high primary tumor stage ($P = 0.035$), tumor grade ($P = 0.013$), tumor size ($P = 0.025$), axillary lymph node involvement ($P < 0.001$), negative estrogen receptor status ($P = 0.008$), negative progesterone receptor status ($P = 0.004$), and low p-p38 expression ($P < 0.001$) were associated with a higher risk of relapse. A multivariate analysis was done including all the baseline clinicopathologic factors (Table 1) and MKP-1. In this analysis, MKP-1 overexpression ($P = 0.016$) retained its adverse prognostic role. For the clinicopathologic factors, age ($P = 0.15$), tumor size ($P = 0.50$), and nodal status ($P = 0.10$) were also significant in this multivariate analysis, whereas estrogen receptor ($P = 0.60$), progesterone receptor ($P = 0.99$), HER2 ($P = 0.94$), TNM stage ($P = 0.72$), grade ($P = 0.49$), and menopausal status ($P = 0.19$) were not significant. Because p-p38 was also significant by univariate analysis, we did a second multivariate analysis, including MKP-1, p-p38, and all the clinicopathologic factors mentioned above. In this analysis, MKP-1 again retained its independent value ($P = 0.015$), whereas p-p38 lost the significance ($P = 0.13$). None of the patients with tumors nonoverexpressing MKP-1 had died at the time of analysis, thus precluding comparisons of overall survival.

Discussion

We report that in human breast cancers, exposed *ex vivo* to doxorubicin, MKP-1 is a regulable enzyme, and in the majority of specimens, doxorubicin significantly reduced its expression. This event was coupled with phosphorylation of JNK and

ERK1/2, thus resembling the pattern reported in breast cancer cell lines. Results in a range of breast lesions also pointed to MKP-1 overexpression as a common event during breast malignant transformation. Finally, MKP-1 overexpression was an independent adverse prognostic factor in breast cancer patients.

Induction of MKP-1 by chemotherapeutic drugs, such as cisplatin or alkylating agents, and proteasome inhibitors limits their cytotoxicity, mainly by inactivation of JNK (3, 4, 14, 15, 44). However, other agents, such as doxorubicin (15) or aplidin (25), repress MKP-1, and this is viewed as part of their antitumor mechanisms of action by allowing a more efficient induction of p-JNK. We confirmed that doxorubicin decreased in a concentration- and time-dependent manner MKP-1 transcripts and protein levels in breast cancer cells. In all the cell lines tested, doxorubicin induced p-JNK and p-ERK1/2. The role of p-JNK as a mediator of apoptosis is well established, whereas the consequences of induction of p-ERK1/2 by doxorubicin are less clear. Although p-ERK1/2 is generally coupled with cell proliferation, a persistent p-ERK1/2 induction may be linked to apoptosis (45). It has to be noted that MKP-1 down-

modulation is not the sole mechanism of ERK1/2 activation by doxorubicin. In this regard, the generation of oxygen free radicals by doxorubicin is involved in ERK1/2 activation (29). p-p38 increased in four of the six lines tested. It is possible that in some breast cancer cells, p38 activity is minimally affected by MKP-1 (18).

We evaluated doxorubicin effects, added *ex vivo*, on MKP-1 in 50 fresh human breast cancers (30, 31). Doxorubicin induced a significant decrease in MKP-1 and an increase in p-JNK and p-ERK1/2. In contrast, p-p38 did not change significantly. This pattern resembles the one observed in breast cancer cell lines. In another study, dexamethasone induced MKP-1 and inhibited p-ERK1/2 and p-JNK. However, p-p38 levels were not significantly affected (18). These observations indicate that the correlation between MKP-1 and p-ERK1/2, p-JNK, and p-p38 in breast cancer is not always straightforward. This variability may be related to doxorubicin effects on MAPKs other than via MKP-1 (16), and also because depending on cell type and context, MKP-1 might dephosphorylate and inactivate any of the three MAPKs (4, 5). Interestingly, only in the tumors that down-modulated MKP-1 level there was a significant increase in p-ERK1/2 and p-JNK. Furthermore, doxorubicin decreased proliferation rates only in tumors with MKP-1 down-modulation (data not shown). Full data on proliferation will be reported in a separate methods manuscript.⁹ There was a subset of tumors with high basal MKP-1 expression in which doxorubicin did not down-regulate, or slightly increased, MKP-1, for as yet unknown reasons. Of note, in breast cancer cells genetically expressing high, irrepressible levels of MKP-1, the ability of doxorubicin to enhance the cytotoxicity of alkylating agents was lost (15). Regardless of mechanisms, we hypothesized that lowering the level of MKP-1 might enhance the ability of doxorubicin to increase its cytotoxicity. Supporting this notion, BT-474 cells pretreated with Ro-31-8220, an agent that reduces MKP-1 expression, were more sensitive to doxorubicin. This finding agrees with an enhanced cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells with genetic suppression of MKP-1 and in MKP-1 knockout mouse embryo fibroblasts (15). However, due to the nonspecific effects of Ro-31-8220, a variety of mechanisms might explain our result (32).

A role of MKP-1 in chemoresistance has been reported for cisplatin in lung and ovarian cancer (43, 44, 46). We have observed an enhancement of cisplatin cytotoxic effects in human non-small cell lung cancer cells when the activity of both MKP-1 and nuclear factor- κ B was blocked.¹⁰ MKP-1 is also induced in response to radiation and limits its apoptotic effects (47). Adding to the complexity of the field, other members of the MKP family are also involved in drug resistance. In this regard, MKP-3 is overexpressed in breast cancer and mediates resistance to tamoxifen (48).

To date, there were two reports on MKP-1 expression in human breast cancer (26, 27). In one study, MKP-1 was overexpressed in the early phases of prostate, colon, and bladder carcinogenesis, with progressive loss of expression with higher histologic grade and in metastases (26). In contrast, breast carcinomas showed significant MKP-1 expression even when poorly differentiated or in late stages of the disease. MKP-1 and

Table 1. Patient clinicopathologic characteristics and MKP-1 overexpression

Characteristic (no. patients)	Overexpressing MKP-1, n (%)	P
Total series of patients (n = 96)	43 (45)	
Menopausal status		0.98
Premenopausal (n = 13)	6 (46)	
Postmenopausal (n = 72)	33 (46)	
Unknown (n = 11)	4 (36)	
Infiltrating tumor type		0.12
Ductal (n = 78)	32 (41)	
Lobulillar (n = 18)	11 (61)	
Tumor grade		0.55
1 (n = 24)	10 (42)	
2 (n = 46)	19 (41)	
3 (n = 26)	14 (54)	
Estrogen receptor		0.59
Negative (n = 20)	10 (50)	
Positive (n = 76)	33 (43)	
Progesterone receptor		0.08
Negative (n = 28)	16 (57)	
Positive (n = 68)	27 (40)	
HER2		0.72
Negative (n = 77)	33 (43)	
Positive (n = 19)	10 (53)	
Primary tumor size		0.45
T1 (n = 48)	19 (40)	
T2 (n = 37)	17 (46)	
T3 (n = 7)	5 (71)	
T4 (n = 4)	2 (50)	
Node stage		0.14
N0 (n = 57)	22 (39)	
N1 (n = 18)	10 (56)	
N2 (n = 10)	4 (40)	
N3 (n = 6)	5 (83)	
NX (n = 5)	2 (40)	
TNM stage		0.22
I (n = 42)	15 (36)	
II (n = 28)	14 (50)	
III (n = 20)	12 (60)	
Unknown (n = 6)	2 (33)	

⁹ F. Rojo et al., in preparation.

¹⁰ Cortes et al., submitted for publication.

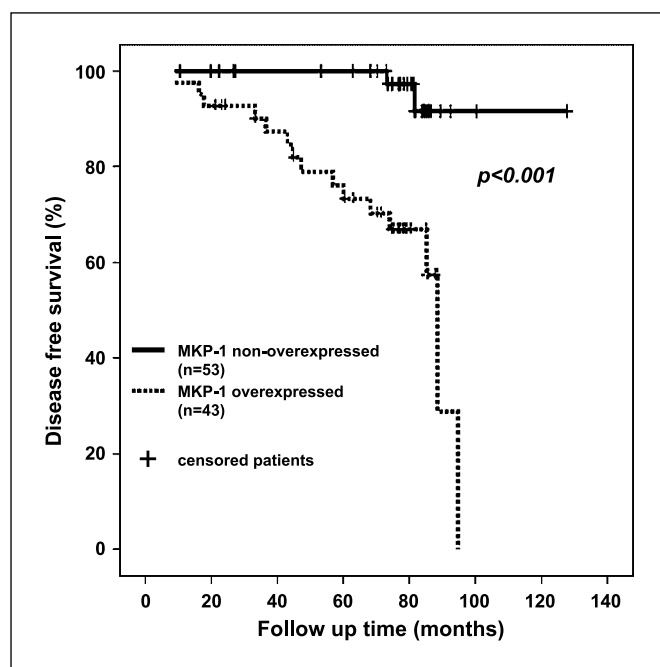


Fig. 5. Actuarial disease-free survival for patients with tumors overexpressing MKP-1 ($n = 43$) versus those nonoverexpressing MKP-1 ($n = 53$), calculated by Kaplan-Meier analysis. See Fig. 3B for numerical data of MKP-1 expression in the entire series.

ERK1/2 were coexpressed in most tumors (26). ERK1 enzymatic activity was elevated despite MKP-1 overexpression. No loss of 5q35-ter (containing the MKP-1 locus) was detected by PCR in metastases compared with primary tumors and no mutations were found in the catalytic domain of MKP-1. MKP-1 was overexpressed in advanced disease stages of breast cancer (26, 27). Our work supports the notion that overexpression of MKP-1 occurs during the malignant transformation of the breast (26). Histologically normal breast ductal and lobular epithelial cells typically exhibited faint and diffuse MKP-1 nuclear staining. In contrast, in *in situ* carcinoma, MKP-1 was almost uniformly overexpressed. In infiltrating carcinoma, MKP-1 overexpression occurred in ~50% of the specimens. Notably, in some specimens, there was overexpression of MKP-1 in the *in situ* carcinoma, whereas it was not overexpressed in the infiltrating areas. This finding agrees with a prior study (26) and is also similar to the pattern reported for HER2 (49). In infiltrating breast cancers, several adverse clinicopathologic features were more

frequent in MKP-1-overexpressing tumors, but there were no statistically significant associations. We also assessed the interplay between MKP-1 and phospho-MAPKs. A significant association was found between MKP-1 overexpression and low p-p38 as well as with high p-ERK1/2. Similarly to our findings, high expression and activity of ERK has been reported in MKP-1-positive breast cancers, suggesting that ERK might be driving, at least in part, MKP-1 expression in unperturbed conditions (10, 26). Decreased activity of JNK1 has been also observed in breast cancers with MKP activity (27). We did not find statistically significant differences in p-JNK, albeit median Hscores were numerically lower in tumors overexpressing MKP-1.

Studies on the prognostic role of MKP-1 in human malignancies are as yet limited. In ovarian cancer, MKP-1 overexpression was associated to a shorter time to disease progression (50). In contrast, in non-small cell lung cancer, MKP-1 overexpression was linked to an improved prognosis (51). The possible reasons to explain this difference include diverse roles of MKP-1 in different malignancies, methodologic issues, or differences inherent to each population study. Here, we report an association between MKP-1 overexpression and high risk of breast cancer relapse by univariate and multivariate analysis. Taking all these considerations into account, it seems that the prognostic role of MKP-1 should be further assessed in larger series with clearly defined patient populations.

In summary, overexpression of MKP-1 occurs during the malignant transformation of the breast and was an independent adverse prognostic factor. Furthermore, MKP-1 is a regulable enzyme in human breast cancers. MKP-1 repression by doxorubicin was associated with a significant increase of phospho-MAPKs, including ERK1/2, JNK, and, in a nonsignificant manner, p-p38. This finding, in clinical specimens, is consistent with the biological role of MKP-1 and may underlay, at least in part, the cytotoxic effects of doxorubicin. Taken together, we believe that these results justify further studies of MKP-1 as a potential target or marker in breast cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Fundació Cellex (Barcelona) for a generous donation to the Group of Molecular Therapeutics and Biomarkers in Breast Cancer (Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar) and Fundacion Mutua Madrileña (CSIC/UAM).

References

- Smigal C, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:168-83.
- Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO-CARE-4 data. *Lancet Oncol* 2007;8:784-96.
- Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:579-85.
- Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:253-61.
- Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* 2007;7:202-12.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279-90.
- Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179-85.
- Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. Distinct binding determinants for ERK2/p38 α and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 2001;276:16491-500.
- Hutter D, Chen P, Barnes J, Liu Y. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem J* 2000;352 Pt 1:155-63.
- Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 1999;286:2514-7.
- Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 2007;26:3203-13.
- Bhalla US, Ram PT, Iyengar R. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* 2002;297:1018-23.
- Liao Q, Guo J, Kleeff J, et al. Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1

- suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 2003;124:1830-45.
14. Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2006;25:3335-45.
 15. Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* 2007;67:4459-66.
 16. Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* 2004;66:1478-90.
 17. Mizuno R, Oya M, Shiomi T, Marumo K, Okada Y, Murai M. Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J Urol* 2004;172:723-7.
 18. Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem* 2005;280:4117-24.
 19. Vogt A, McDonald PR, Tamewitz A, et al. A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:330-40.
 20. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, et al. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:665-75.
 21. Awada A, Albanell J, Canney PA, et al. Bortezomib/docetaxel combination therapy in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer: a phase I/II dose-escalation study. *Br J Cancer* 2008;98:1500-7.
 22. Chen YW, Huang SC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* 2005;26:1296-306.
 23. Shi YY, Small GW, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:33-47.
 24. Small GW, Somasundaram S, Moore DT, Shi YY, Orlowski RZ. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:861-9.
 25. Gonzalez-Santiago L, Suarez Y, Zarich N, et al. Aplidin induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ* 2006;13:1968-81.
 26. Loda M, Capodiceci P, Mishra R, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 1996;149:1553-64.
 27. Wang HY, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003;191:229-37.
 28. Vogt A, Tamewitz A, Skoko J, Sikorski RP, Giuliano KA, Lazo JS. The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 2005;280:19078-86.
 29. Tierno MB, Johnston PA, Foster C, et al. Development and optimization of high-throughput *in vitro* protein phosphatase screening assays. *Nat Protoc* 2007;2:1134-44.
 30. Di Nicolantonio F, Knight LA, Whitehouse PA, et al. The *ex vivo* characterization of XR5944 (MLN944) against a panel of human clinical tumor samples. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1631-7.
 31. van der Kuip H, Murdter TE, Sonnenberg M, et al. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 2006;6:86.
 32. Beltman J, McCormick F, Cook SJ. The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1996;271:27018-24.
 33. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, et al. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor α expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 2001;61:6500-10.
 34. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.
 35. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, et al. Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Mod Pathol* 2000;13:730-5.
 36. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-45.
 37. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
 38. Piazza E, Donelli MG, Broggini M, et al. Early phase pharmacokinetics of doxorubicin (adriamycin) in plasma of cancer patients during single- or multiple-drug therapy. *Cancer Treat Rep* 1980;64:845-54.
 39. Wu JJ, Bennett AM. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem* 2005;280:16461-6.
 40. Rojo F, Tabernero J, Albanell J, et al. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4309-16.
 41. Liu CL, Prapong W, Natkunam Y, et al. Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *Am J Pathol* 2002;161:1557-65.
 42. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18:207-8.
 43. Wang J, Zhou JY, Wu GS. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:11933-41.
 44. Wang Z, Xu J, Zhou JY, Liu Y, Wu GS. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res* 2006;66:8870-7.
 45. Stanciu M, DeFranco DB. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line. *J Biol Chem* 2002;277:4010-7.
 46. Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 2000;19:5142-52.
 47. Wang Z, Cao N, Nantajit D, Fan M, Liu Y, Li JJ. MKP-1 represses JNK-mediated apoptosis via NF- κ B regulation. *J Biol Chem* 2008.
 48. Cui Y, Parra I, Zhang M, et al. Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer Res* 2006;66:5950-9.
 49. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma *in situ* to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2002;15:1318-25.
 50. Denkert C, Schmitt WD, Berger S, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2002;102:507-13.
 51. Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:3639-49.

The role of the NFκB signalling pathway in cancer

María Cortés Sempere · Vanesa Rodríguez Fanjul · Isabel Sánchez Pérez · Rosario Perona

Received: 10 December 2007 / Accepted: 8 January 2008

Abstract The nuclear factor kappa B (NFκB) signalling pathway regulates the expression of hundreds of genes that are involved in different cellular processes such as cell proliferation, survival, stress responses, cellular immunity and inflammation. Its aberrant regulation is involved in several pathologies, but its relevance in cellular transformation and cancer development has been extensively studied. Mutations in the core components of NFκB as well as in the cellular machinery that regulates its activation have been found in many types of tumours. On the other hand, its role in promoting cell survival is an important obstacle in many cancer therapies. The development of chemical inhibitors that block NFκB activation acting either directly on IKKs or on the proteasome machinery has shown antitumour and proapoptotic activity both in preclinical and clinical studies.

Keywords rel · NFκB · IκB · Bortezomib · IKK

The nuclear factor κB (NFκB) signal transduction pathway is a complex network that regulates a cellular pathway that controls the expression of hundreds of genes involved in a myriad of physiological and pathological scenarios. Active NFκB transcription factors are dimeric and composed of a

combination of members of the rel transcription factor family. Five different rel family members have been identified in mammals: relA (p65), relB, c-rel, NFκB1 (p50 and its precursor p105) and NFκB2 (p52 and its precursor p100) (Fig. 1). This family can associate in homo- or heterodimer combinations by virtue of their rel Homology domain (RHD), which contains sequences required for DNA binding, dimerisation, nuclear localisation and inhibitor (IκB) binding. These combinations are retained inactive in the cytoplasm, by binding with the inhibitory family of proteins IκBs [1]. There are two subfamilies in the NFκB transcription factors: the NFκB and the rel family. The NFκBs p105 and p100 are distinguished by the C-terminal domains, which include an IκB-like inhibitory domain that contains several copies of the ankyrin repeat (ANK). As a consequence, these proteins are synthesised as inactive precursor proteins (p100 and p105) that are processed by a proteasome-mediated proteolysis to their mature forms, able to bind DNA, p52 and p50 respectively. The rel subfamily of proteins (c-rel, relA and relB) are not proteolytically processed and contain C-terminal transactivation domains that are unrelated to one another.

NFκB and rel homo- or heterodimers can bind to their target sites on DNA, called κB sites. However the affinity of individual subunits to one another or to DNA binding sites can be variable. The regulation of NFκB degradation involves a family of IκB kinases (IκKs) and the ubiquitin E3 ligase SCF/bTrCP.

*Supported by an unrestricted educational grant from Pfizer.

M. Cortés Sempere · V. Rodríguez Fanjul · I. Sánchez Pérez · R. Perona (✉)
Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM
Translational Oncology Unit
Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Raras
C/ Arturo Duperier, 4
ES-28029, Madrid, Spain
e-mail: Rperona@iib.uam.es

Canonical and non-canonical NFκB signalling pathways

Two different signalling pathways are involved in NFκB activation [2] (Fig. 2). The activation events that modulate these pathways are mediated by a family of kinases called

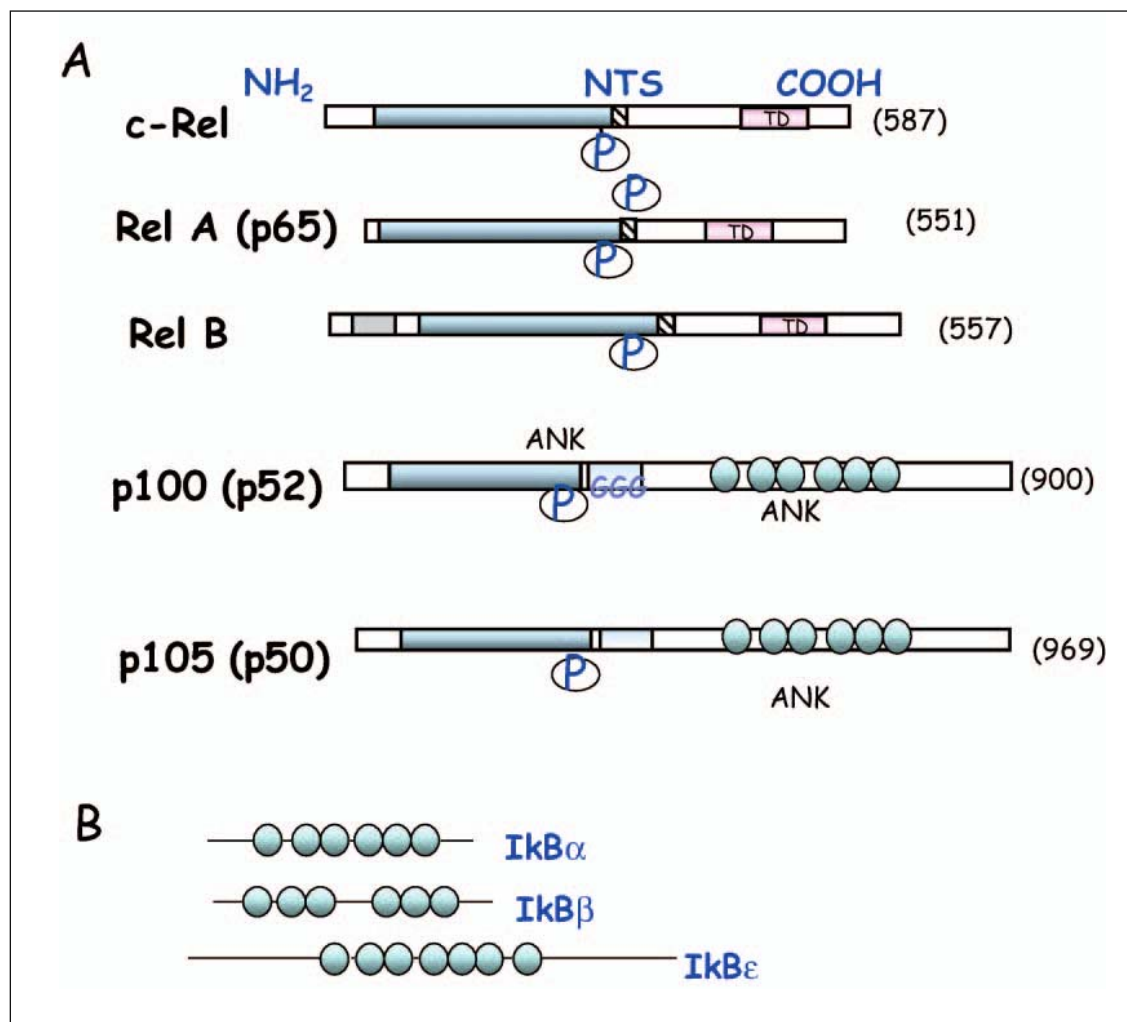


Fig. 1 The mammalian members of the NFκB family. **a** The NFκB family. In mammalian cells there are three NFκB members. The rel family: c-rel, p65/relA and relB. The NFκB2 family p105 and p100 give rise to the mature forms p50 and p52 respectively. **b** The IκB family. The inhibitor κB family consists of IκBα, IκBβ and IκBε. Like p105 and p100, the IκB proteins contain ANK motifs in their C termini

the IκKs (inhibitory kappa kinases). The IκK complex consists of three core subunits, the catalytic subunits IκKα and IκKβ (also known as IκK1 and IκK2) and several copies of a regulatory subunit called NFκB essential modifier (NEMO, also known as IκKγ). The canonical pathway is induced mainly by IκB kinase β (IκKβ) thorough phosphorylation of either the three canonical IκB proteins, mainly IκBα but also IκBβ and IκBε. This phosphorylation signals degradation of the protein by the 26S proteasome.

The non-canonical pathway is activated thorough IκKα and by the NFκB inducing kinase (NIK) and utilises the p52 precursor protein p100. p100 is processed by the 26S proteasome. p52/relB heterodimers are activated by the non-canonical pathway and have higher affinity for distinct κB elements and might regulate expression of a more specific set of NFκB genes than those activated by the canonical pathway.

Activators of the canonical pathway include various inflammatory stimuli, including pro-inflammatory cytokines,

tumour necrosis factor α (TNFα) and interleukin 1 (IL-1), engagement of the T-cell receptor (TCR) and exposure to bacterial products such as lipopolysaccharides (LPS) [3]. Other activation mechanisms of the canonical pathway are also genotoxic stimuli such as ionising radiation or some therapeutic drugs that induce DNA damage.

The non-canonical pathway is activated by stimuli such as the CD40 and lymphotoxin-β-receptors, B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF), LPS and latent-membrane protein (LMP-1) or Epstein-Barr virus [2, 4].

The canonical pathway has been involved in development, immunity and cancer development. On the other hand, the non-canonical pathway regulates survival of premature B-lymphocytes and development of peripheral lymphoid tissues. Different pathogens, growth factors, cytokines and carcinogens that induce activation of the canonical pathway (p50/relA) have been involved in cancer progression.

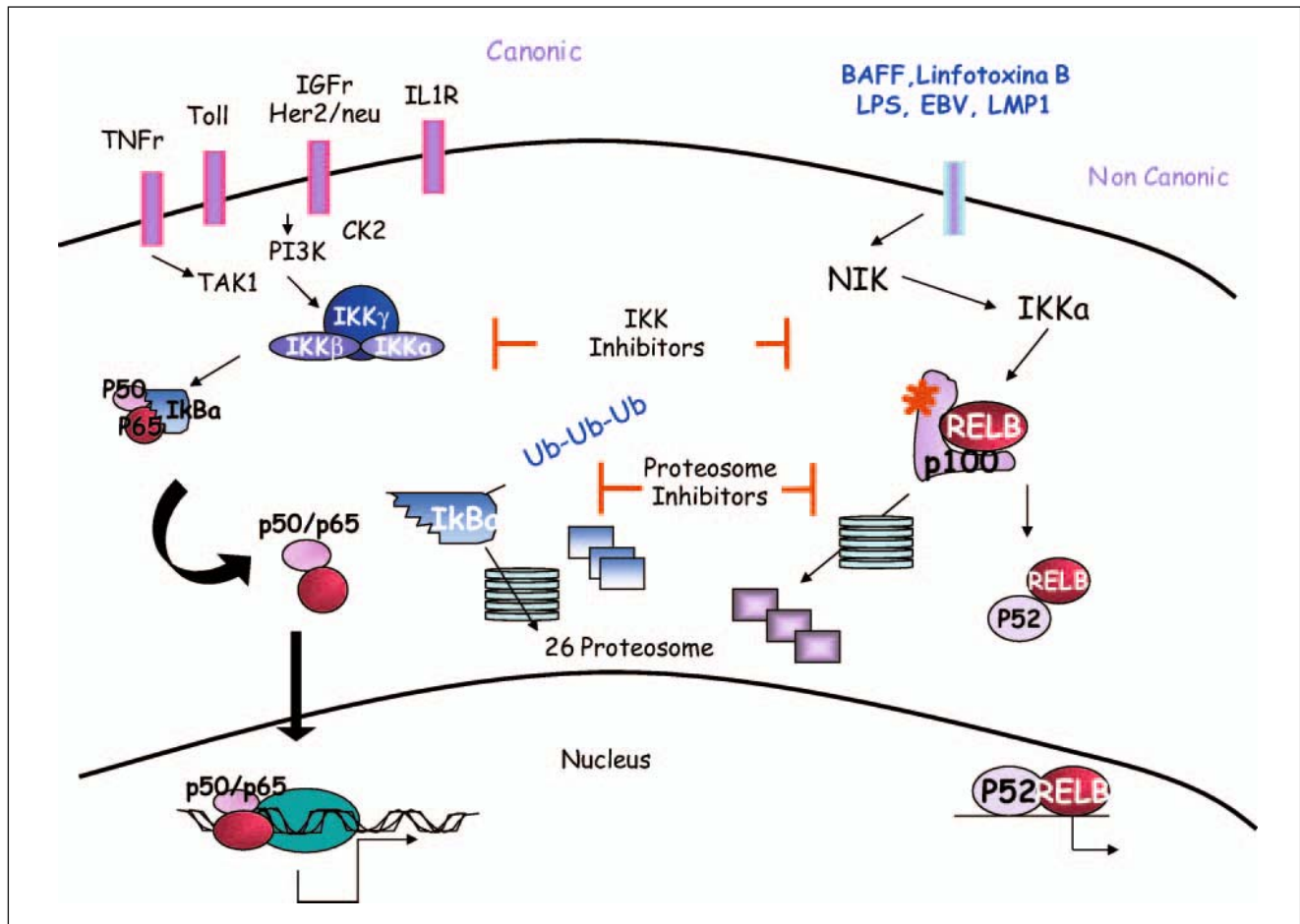


Fig. 2 NFκB signalling pathways. The canonical pathway is modulated mainly by IκB through phosphorylation of IκBα that signals degradation of the protein by the 26S proteasome. The IκK complex consists of three core subunits, the catalytic subunits IκKα and IκKβ and the regulatory subunit IκKγ. The non-canonical pathway is activated through IκKα and by NIK, which phosphorylates p100 and is processed by the 26S proteasome. Red highlights inhibitors of the kinases and the proteasome

Genetic alterations of the NFκB signalling pathway in cancer

Different modifications in the sequence, due to mutations, gene deletions or genetic rearrangements have been found in different members of this signalling pathway in different tumours. We will summarise here the more relevant ones.

Rel gene alterations

The human REL gene is the most frequently altered among the NFκB signalling pathway. The genetic alterations are amplifications, deletions, point mutations and occur more frequently in B cells [5]. Rel gene amplifications are related mainly to Hodgkin's lymphoma (HL) and non-Hodgkin's B-cell lymphomas [6]. The amplification includes REL and several other genes, but REL is the only gene that overlaps in these lymphoma-associated amplifications [6]. The mechanism by which c-rel induces oncogenesis is a

consequence of the increasing gene copy number that saturates and overcomes the IκB inhibitory system. Different experimental evidence suggests that overexpression of rel leads to enhanced mature B-cell proliferation and survival. Indeed, rel target genes have been found to be overexpressed in mono-diffuse large-B-cell lymphomas. Furthermore, rel mRNA expression has been associated with poor prognosis in splenic marginal B-cell lymphomas. Accordingly, inhibition of rel expression by SiRNA or chemical inhibitors has been shown to block large B-cell lymphoma growth.

REL gene rearrangements or deletions have been detected very rarely in human lymphomas and include REL gene translocated to a position near the light chain enhancer, a truncated REL gene near the C-terminus and integration of Epstein-Barr virus near to REL, which resulted in increased REL expression [7]. Point mutations, (ser/pro) located into the transactivation domain of rel (ser525) have been recently detected in two human B-cell lymphomas. In all cases increased levels of REL-activated genes are found in the tumours.

NFκB2 gene alterations

Alterations in the NFκB2 locus have been found in 2% of human B- and T-cell leukaemias and lymphomas [8]. These changes included structural alterations in sequences of the ANK repeats that are removed, but the p52 sequence remains unaltered. These truncated p100 proteins (p52) are often overexpressed, whereas the p100 encoding allele is often deleted or not expressed. These truncated p100 proteins have been shown to be weakly oncogenic in mouse fibroblast.

Alterations in genes encoding IκB

Inactivating mutations in the IκB gene have been found in HL. Mutations have been found in Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) cells and retroviral insertions have been found in mouse lymphomas. These mutations increase IκB turnover and consequently no IκB proteins are detected. As a consequence there is a constitutive NFκB signalling and several NFκB target genes are overexpressed, including those encoding anti-apoptotic and growth factor promoting proteins [9].

Increased expression of BCL3

BCL3 encodes an IκB-like protein that serves as a co-activator for p50 and p52 homodimers. Some patients with B-cell CLL have a chromosomal translocation in which BCL3 gene becomes positioned 3' to the switch region or the immunoglobulin heavy chain gene. Such overexpression of BCL3 is expected to result in increased transcription of genes normally regulated by p52 or p50 homodimers [10].

Constitutive activation of NFκB

Numerous studies of the literature have described, either in cell lines or in tumour samples, a constitutive activation of the NFκB pathway, and this has been related either to tumorigenesis or therapy resistance. This is the case for human lymphomas, as described above, and also for carcinomas of head and neck, oesophagus, pancreas, prostate, lung, colon and cervix. Besides modifications on the members of the NFκB sequence itself, modifications of the upstream molecules that regulate activation plays an important role in tumorigenesis. Overexpression of different tyrosine kinase receptors, such as epidermal growth factor (EGF), Her2/neu, hepatocyte growth factor (HGF) and others such as IL1 results in activation of the NFκB pathway [11]. The participation of these growth factor receptors varies among different tumours. Involvement of EGFr and Her2/neu signalling has been demonstrated in activation of NFκB in breast cancer where is mediated by activation of PI3-kinase and IKK. In head and neck cancer, activation of

EGFr, IL1, PI3Kinase, akt and IKK mediate activation of NFκB. For prostate carcinomas, activation of HGF, PI3K and IKK mediate NFκB signalling. Likewise, activation of IKK and CK2 is observed in colon carcinoma.

On the other hand, many genes involved in cell proliferation, tumorigenesis, cell migration and survival are activated by NFκB. Targets of NFκB are genes such as cyclin D1, BclX1, inhibitors of caspases (IAPs), GRO1, IL8, Bax, Bcl2 and VEGF. In short, genes whose expression is activated by NFκB contribute to the transformed phenotype in human tumours by controlling both proliferation and survival [12–14]. Furthermore, as some chemotherapeutic agents also induce an activation of NFκB, the outcome of different therapies would be influenced by both the basal NFκB activation on each tumour and that resultant from the elected therapy.

Inhibition of NFκB in cancer treatment

Different strategies have been implemented in order to inhibit basal NFκB activation, because of the relevance of this process in cancer and other human pathologies, such as those related with inflammation.

Proteasome inhibitors

Proteasome regulates the degradation of IκB and hence inhibits NFκB, as well as degradation of other cellular proteins. The proteasome inhibitor bortezomib has been shown to have clinical activity and has been approved for the treatment of multiple myeloma [15]. Multiple myeloma cells are very sensitive to NFκB inhibition and bortezomib has NFκB-dependent and -independent activity on these cells. A limited activity of this drug as a single therapy has been described in solid tumours such as metastatic melanoma, colon, breast, prostate and renal cell carcinomas, as well as for refractory cutaneous T-cell lymphoma [16–21].

Evidence has also been obtained of clinical activity with different combinations of bortezomib and other agents. Phase I trials have been conducted with bortezomib in combination with carboplatin in patients with platinum- and taxane-resistant ovarian cancer [22], and also for non-small-cell lung cancer in combination either with pemetrexed [23] or gemcitabine and carboplatin [24]. Results of these studies have been used to design phase II trials. The efficiency of bortezomib in combination with targeted therapies in solid malignancies is being studied in phase II trials.

IKK inhibitors

Preclinical evidence, using knock-out models, indicates that inhibition of IKKβ and p65 sensitises cells to apoptosis in response to different therapies. Two antagonists of

IKK β that efficiently inhibit I κ B degradation have been extensively studied at the preclinical level. BMS-345541 (Bristol Myers, Princeton, NJ) has shown apoptotic and anti-tumour activity in melanoma xenograft models [25]. PS-1145 or ML120b (Millennium Pharmaceuticals) has shown

activity in multiple myeloma cells, chronic myelogenous leukaemia, diffuse large B-cell lymphoma and prostate carcinoma cells [26–28]. The range of activity of these compounds is at a micromolar level but no clinical studies have been carried out with these inhibitors.

References

- Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49–62
- Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280–288
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195–2224
- Perkins ND (2003) Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF-kappaB. *Oncogene* 22:7553–7556
- Kalaitzidis D, Ok J, Sulak L 2nd et al (2004) Characterization of a human REL-estrogen receptor fusion protein with a reverse conditional transforming activity in chicken spleen cells. *Oncogene* 23:7580–7587
- Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y et al (2006) Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 97:499–504
- Barth TF, Bentz M, Leithäuser F et al (2001) Molecular-cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastro-intestinal tract. *Genes Chromosomes Cancer* 31:316–325
- Neri A, Fracchiolla NS, Migliazza A et al (1996) The involvement of the candidate proto-oncogene NFKB2/lyt-10 in lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma* 23:43–48
- Hinz M, Löser P, Mathas S et al (2001) Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 97:2798–2807
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V et al (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72: 729–739
- Van Waes C (2007). Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res* 13:1076–1082
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG et al (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680–1683
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY et al (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19:5785–5799
- Chen C, Edelstein LC, Gélinas C (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20:2687–2695
- Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC (2006) Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57:33–47
- Papandreou CN, Daliani DD, Nix D et al (2004) Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 22:2108–2121
- Davis NB, Taber DA, Ansari RH et al (2004). Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol* 22:115–119
- Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L et al (2004) Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 22:3720–3725
- Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F et al (2005) A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 103:2584–2589
- Mackay H, Hedley D, Major P et al (2005) A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11:5526–5533
- Yang CH, Gonzalez-Angulo AM, Reuben JM et al (2006) Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Ann Oncol* 17:813–817
- Ramirez PT, Landen CN Jr, Coleman RL et al (2008). Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in combination with carboplatin in patients with platinum- and taxane-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 108:68–71
- Davies AM, Ho C, Metzger AS et al (2007) Phase I study of two different schedules of bortezomib and pemetrexed in advanced solid tumors with emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:1112–1116
- Davies AM, Ruel C, Lara PN et al (2008) The proteasome inhibitor bortezomib in combination with gemcitabine and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a California Cancer Consortium Phase I study. *J Thorac Oncol* 3:68–74
- Yang J, Amiri KI, Burke JR et al (2006) BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways. *Clin Cancer Res* 12:950–960
- Lam LT, Davis RE, Pierce J et al (2005) Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11:28–40
- Cilloni D, Messa F, Arruga F et al (2006) The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* 20:61–67
- Yemelyanov A, Gasparian A, Lindholm P et al (2006) Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF-kappaB function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 25:387–389

Report

Inhibition of the Canonical IKK/NF κ B Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin

Maria A. Tapia¹
Irene González-Navarrete²
Alba Dalmases²
Marta Bosch¹
Vanessa Rodriguez-Fanjul³
Mark Rolfe⁴
Jeffrey S. Ross^{4,5}
Jovita Mezquita⁶
Cristobal Mezquita⁶
Oriol Bachs⁷
Pere Gascón¹
Federico Rojo^{2,8}
Rosario Perona³
Ana Rovira^{1,2}
Joan Albanell^{1,2}

¹Laboratory of Experimental Oncology; Medical Oncology Department; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); Hospital Clínic i Provincial de Barcelona; Barcelona, Spain

²Medical Oncology Department; Experimental Therapy of Cancer Research Unit (URTEC); IMIM-Hospital del Mar, PRBB; Barcelona, Spain

³Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM; Madrid, Spain

⁴Millennium Pharmaceuticals, Inc.; Cambridge, Massachusetts USA

⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine; Albany Medical College; Albany, New York USA

⁶Laboratory of Molecular Genetics; ⁷Department of Cell Biology and Pathology; IDIBAPS, Faculty of Medicine; University of Barcelona; Barcelona, Spain

⁸Department of Pathology; Hospital del Mar-IMAS; Barcelona, Spain

*Correspondence to: Joan Albanell; Medical Oncology Department; Hospital del Mar; Passeig Marítim; 25-29 08003 Barcelona, Spain; Tel.: 34.93.248.3137; Fax: 34.93.248.3366; Email: jalbanell@imas.imim.es

Original manuscript submitted: 02/24/07

Revised manuscript submitted: 07/10/07

Manuscript accepted: 07/10/07

Previously published online as a *Cell Cycle* E-publication:
<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/4721>

KEY WORDS

NF κ B, chemoresistance, doxorubicin, bortezomib, NEMO-binding domain inhibitory peptide

ABSTRACT

The NF κ B family is composed by five subunits (p65/RelA, c-Rel, RelB, p105-p50/NF κ B₁, p100-p52/NF κ B₂) and controls the expression of many genes that participate in cell cycle, apoptosis, and other key cellular processes. In a canonical pathway, NF κ B activation depends on the IKK complex activity, which is formed by three subunits (IKK α and IKK β and IKK γ /NEMO). There is an alternative NF κ B activation pathway that does not require IKK β or IKK γ /NEMO, in which RelB is a major player. We report in a panel of human breast cancer cells that the IKK/NF κ B system is generally overexpressed in breast cancer cells and there is heterogeneity in expression levels of individual members between different cell lines. Doxorubicin, an anticancer agent used in patients with breast cancer, activated NF κ B and appeared to be less effective in cells expressing predominantly members of the canonical IKK/NF κ B. Two NF κ B inhibitors, bortezomib and NEMO-Binding Domain Inhibitory Peptide, prevented doxorubicin-induced NF κ B activation and increased doxorubicin antitumor effects in BT-474 cells. Transient down-regulation of members of the canonical pathway (p65, p52, c-Rel and IKK γ /NEMO) by siRNA in HeLa cells increased doxorubicin cytotoxicity. In contrast, silencing of RelB, a key subunit of the alternative pathway, had no evident effects on doxorubicin cytotoxicity. To conclude, NF κ B inhibition sensitized cells to doxorubicin, implying directly p65, p52, c-Rel and IKK γ /NEMO subunits in chemoresistance, but not RelB. These findings suggest that selective inhibition of the canonical NF κ B pathway is sufficient to improve doxorubicin antitumor effects.

INTRODUCTION

The nuclear factor- κ B (NF κ B) pathway controls the expression of many genes that participate in cell cycle, immune responses, angiogenesis, cell adhesion and apoptosis, relating it to the control of a wide variety of pathological conditions.^{1,2} The NF κ B family is composed of five subunits; three of them containing a transactivation domain—p65/RelA, c-Rel and RelB—and two others without it—p105-p50/NF κ B₁ and p100-p52/NF κ B₂. There are two known NF κ B activation pathways. A first pathway is termed classical or canonical, where NF κ B activation depends on the IKK complex activity and I κ B degradation. In resting cells NF κ B proteins form cytoplasmic dimers associated to the inhibitory I κ B proteins (I κ B- α , I κ B- β or I κ B- ϵ). I κ Bs mask the nuclear localization signal (NLS) of NF κ B proteins, keeping them inactive in the cytoplasm. The canonical pathway is activated by different stimuli, classically proinflammatory cytokines, whose transduction signal activates the IKK complex, formed by three subunits—IKK α and IKK β and IKK γ /NEMO. After activation, IKK β phosphorylates inhibitory I κ Bs triggering their ubiquitination and subsequent proteasomal degradation. This releases NF κ B dimers—commonly p65-p50 but also others involving p52, and allows them to translocate to the nucleus, where they activate the transcription of their target genes.^{3,4} The canonical pathway is principally related to inflammation, cell proliferation and survival signals. A second NF κ B activation pathway, named alternative, does not require the subunits IKK β nor IKK γ /NEMO, since in this case the transduction signal converges on the protein kinase NIK, which activates dimers of IKK α . This pathway is characterized by the absence of p65 or c-Rel subunits and by the presence of p100-RelB heterodimers, in which p100 acts as the inhibitory subunit. Phosphorylation of p100 by IKK α promotes its cleavage, releasing the fragment containing ankyrin repeats. The resulting p52-RelB dimer translocates to the nucleus, where it activates genes involved in humoral immunity and cell differentiation.^{3,4}

Preclinical and clinical data support a role for NF κ B in the development and progression of human malignancies.⁵ There is also increasing evidence that NF κ B plays a role in chemoresistance.⁶ Preclinical studies have shown that several chemotherapeutic agents activate the NF κ B pathway.^{7,8} The resulting expression of anti-apoptotic proteins regulated by NF κ B limits then the anti-tumor activity of cancer therapies.⁹ We focused the present work in studying the role of NF κ B in doxorubicin resistance for various reasons. First, doxorubicin is a chemotherapeutic agent from the anthracyclines group which is widely used for breast cancer treatment as well as in other malignancies. Anthracyclines are topoisomerase II inhibitors and produce DNA damage, that is a critical signal for NF κ B activation.^{10,11} Furthermore, NF κ B inhibition may enhance the cytotoxicity of anthracyclines.¹² In addition to experimental observations, we and others have reported that breast cancer patients with constitutively active NF κ B in tumor cells were significantly more resistant to doxorubicin-based chemotherapy than patients with no basal NF κ B activation.¹² We also found that NF κ B appeared to be activable during chemotherapy exposure in some patients' tumors.

Intense efforts in the development of NF κ B inhibitors for cancer treatment and particularly for reverting chemoresistance justify the need for further characterization and understanding of the NF κ B pathway in human cancer. Here we show that there is a great diversity in the expression of individual members of the IKK/NF κ B pathway in human breast cancer cells with a parallelism between a conserved expression of members of the canonical pathway and doxorubicin resistance. Notably, by using both pharmacological and genetic approaches, inhibition of the canonical NF κ B pathway was sufficient to increase the cytotoxicity of doxorubicin.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cultures. Six human breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, BT-474, MCF-7), a human cervical cancer cell line (HeLa) and a mammary epithelial one as control (MCF-10A) were purchased from the American Type Culture Collection and cultured at 37°C with 5% CO₂ in DMEM (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT-474, SK-BR-3, HeLa) or DMEM/F12 (MCF-7) supplemented with 2mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum. For BT-474, insulin (0.01 μ g/ml) was added. Line MCF-10A was cultured in MEMB Basal Medium (Clonetics, cat. No. CC-3151) supplemented with MEGM Singlequots (Clonetics, cat. No. CC-4136): 2ml BPE, 500ng/ml hydrocortisone, 10ng/ml hEGF and 5 μ g/ml insulin. The rest of culture medium and supplements were obtained from Gibco-BRL.

Recombinant human TNF α was purchased from Calbiochem. Bortezomib was kindly provided by Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA, USA); 10mM aliquots of drug in DMSO were stored at -20°C, thawed, and diluted just before use. NEMO-Binding Domain Inhibitory Peptide was purchased from Calbiochem (cat. No 480025). Doxorubicin (D1515) and all chemicals not otherwise specified below were purchased from Sigma.

MTS viability assay. The effects of doxorubicin on the proliferation and viability of breast cancer cells were studied using the colorimetric method provided by the MTS-CellTiter 96 Aqueous Non-Radiative Cell Proliferation Assay Kit (Promega). MTS assay is a modification from MTT assay and depends on two solutions:

a tetrazolium compound (MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; PMS). MTS is bio-reduced by cells into a formazan product. The conversion of MTS into aqueous, soluble formazan is accomplished by dehydrogenase enzymes found in cells that are metabolically active. The quantity of formazan product as measured by the amount of 490 nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture (21). We performed the MTS assay in 96-well flat-bottomed plates (Nunc). Approximately 1 x 10⁴ cells were seeded in 100 μ l of drug free media and incubated for 24h before drug treatment. 100 μ l of various 2x drug concentration (1x final concentration) were added for times from 24 to 48h. Forty microliters of MTS/PMS solution were added to the wells, and the cells were further incubated for 2–4h. The amount of soluble formazan produced, by cellular reduction of the MTS, was measured by the absorbance on a microplate spectrophotometer (Molecular Dynamics) at 490 nm (test wavelength) and 690 nm (reference wavelength). The percentage of surviving cells was estimated by dividing the A₄₉₀–A₆₉₀ nm of treated cells by the A₄₉₀–A₆₉₀ nm of control cells. Approximate IC₅₀ values were determined from the dose response curve. Data were derived from at least three independent experiments.

Western blot. For cytoplasmic western blot assays, cells were cultured in 6 well plates and lysed in ice-cold Nonidet P-40 buffer [1%NP40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, EDTA 5 mM containing 5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSE, Leupeptin 5 μ g/ml and Aprotinin 5 μ g/ml]. After incubating for 30 min at 4°C, the samples were centrifuged, and the supernatant was kept as the NP-40-soluble fraction.

Nuclear cell extracts were obtained essentially as described in ref. 13. Samples (10 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE and transferred to nylon membranes (BioRad). Western blotting was carried out according to a standard procedure using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham). Target proteins were visualized after enhanced chemiluminescence treatment of membranes and subsequent exposure to X-ray film (Amersham). The following primary antibodies were used: p65-NLS (MAB3026, Chemicon International, Inc.); p65 (C-20, SC-372), p50 (H-119, SC-7178), p52 (K-27, SC-298), c-Rel (SC-71), RelB (C-19, SC-226), IKK γ (B-3, SC-8032), I κ B- β (C-20, SC-945), I κ B- ϵ (M-121, SC-7156) and Nucleoline (MS-3, SC-8031) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies to P-NF κ Bp65 Ser536 (1673031S), IKK α (2682), IKK β (2684), IKK γ (2685), I κ B- α (9242) are from Cell Signalling Technology; Monoclonal Anti-Beta-Actin (A-5316) and Monoclonal Anti-Alpha-Tubulin (T-5238) from Sigma, and anti-IKK gamma (residues 2-13) from Abcam Limited, Novus-Biologicals.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts were obtained as for Western blotting described above. EMSAs were carried out with a ³²P-labeled NF κ B and Oct1 probe using a Gel Shift Assay Core System kit (Promega), according to the manufacturer's instructions.¹⁴ After electrophoresis, gels were fixed in 10% acetic acid-30% ethanol buffer during 15 min, and then dried under vacuum and exposed to X-ray film for three days. In some cases, a competition assay to determine sequence-specificity of protein-DNA interactions was performed by using 25-fold excess of unlabeled NF κ B-probe. For supershift analysis, anti-p50 and anti-p65 antibodies were incubated with the nuclear extracts for 15 min prior to the addition of the radiolabeled probe.

Immunofluorescence (IF). Briefly, cells were seeded in 35-mm tissue culture plates on sterile glass coverslips. After appropriate treatments, cells were washed with PBS and fixed with a mixture of methanol and acetone for 1 h. After blocking with 1% (w/v) bovine serum albumin in PBS for 30 minutes at 37°C, cells were incubated with anti-NF κ B p65 antibody (1:200 dilution) for one hour at room temperature. Then, slides were washed with TBS-T and incubated with the secondary antibody Alexa 546-coupled goat anti-rabbit IgG (1:1000 dilution in PBS plus 1% bovine serum albumin) for an additional hour (Invitrogen). The slides were further washed with TBS-T and then mounted using Mowiol coverslip solution (Mowiol 4.88, Calbiochem). For co-localization experiments on the same cells, double immunofluorescence techniques were used. **Control and treated cells** were fixed, permeabilized, and incubated with a mixture of both anti-p50 rabbit (1:100 dilution) and anti-p65 mouse (1:200 dilution) antibodies. Secondary detection antibodies were Alexa 488-coupled goat anti-rabbit IgG and Alexa 555-coupled goat anti-mouse IgG (1:1000 dilutions) generating green fluorescence and red fluorescence for polyclonal and monoclonal antibodies, respectively. Nuclei were stained with DAPI.

IF slides were evaluated in 10 intermediate-power fields of slides (x250 optical magnification) and photographed using DP71 digital camera applied to a Fluorescence BX51 Olympus microscope.

siRNA and transient cell transfection. The TranSilent™ Human NF κ Bp65 shRNA Vector (Panomics, Ref. SR1005) was purchased for p65. To generate knockdown vectors for the different subunits of NF κ B, specific oligonucleotides encoding short hairpin RNAs were ligated into pSUPERretro vector (OligoEngine), following the commercial protocol.¹⁵ Oligonucleotides used were: 5'-GGTGATG GATCTGAGTATA-3' for p52, 5'-CATACCCTTCTATCCAGAT-3' for c-Rel, 5'-TTG GAG ATC ATC GAC GAGT-3' for RelB and 5'- GATTGTGATGGAGACCGTT-3' for IKK γ /NEMO. Bacterial colonies were pooled and used for plasmid preparation. Cells at 50% confluence were transfected with 6 μ g of DNA using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's specifications. After three days, cells were subjected to Western blot analysis and MTS assay in the presence or absence of doxorubicin.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out with SPSS version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). To analyze correlations the unpaired t test was used to determine the statistical differences. Statistical tests were conducted at the two-sided 0.05 level of significance.

RESULTS

Cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells and IKK/NF κ B expression. Doxorubicin effects on cell viability were tested in a panel of six breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, BT-474 and MCF-7) by MTS assay (Fig. 1). MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3 cells showed an IC₅₀ at 48 h lower than 15 μ M, and BT-474 and

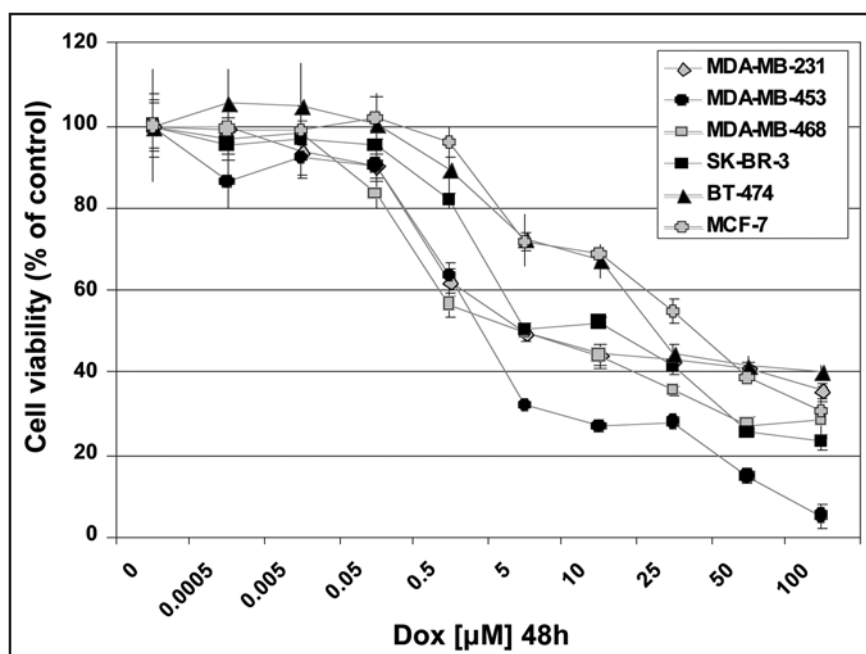


Figure 1. Doxorubicin effects on breast cancer cells. Cell viability MTS assay to test the effects of doxorubicin on six breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, BT-474, MCF-7) treated with the drug for 48 h. All values are means of independent triplicate experiments.

MCF-7 cell lines had an IC₅₀ ~40–50 μ M. Based on these results, we considered BT-474 and MCF-7 cell lines relatively resistant to doxorubicin. A non malignant breast epithelial cell line (MCF-10A) was also assayed by MTS. The sensitivity of this cell line appeared to be intermediate, with an IC₅₀ ~20–25 μ M at 48 h.

We then assayed by Western blot the expression of individual members of the IKK/NF κ B system in our chosen panel of cell lines (Fig. 2). Specifically, we assayed NF κ B subunits (p65/Rel-A, p50-105/NF κ B₁, p52-100/NF κ B₂, c-Rel, RelB) (Fig. 2A), IKK complex isoforms (IKK α , IKK β and IKK γ /NEMO) (Fig. 2B), and NF κ B inhibitory proteins (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ) (Fig. 2C). We also used a p65 antibody that recognizes the NLS of p65. Therefore, the antibody selectively binds to the presumably activated form of NF κ B (here named as p65-NLS). IKK/NF κ B proteins were generally overexpressed in malignant cell lines in comparison with the non-malignant cell line. All tumor cell lines had similar levels of p65. For other subunits, there were marked differences in protein expression levels between different cell lines. There was higher expression of activated p65-NLS in BT-474 cells in comparison with others. c-Rel and RelB, both with transactivation domain, and the inhibitory subunit p100 (Fig. 2A, upper band), had higher expression levels in MDA-MB-468 and SK-BR-3 cells, while p52 showed lower levels in SK-BR-3 and especially in MCF-7; subunit p50 was lower in BT-474 and p105 (Fig. 2A, upper band) showed similar expression in all cell lines.

The expression of IKK complex isoforms also varied among cell lines. In some cells, a shorter (37 kDa) band was recognized by an anti-C-terminal IKK γ /NEMO antibody independent of the presence of the native 50kDa band that corresponds to the full length IKK γ /NEMO protein. This 37kDa band was also detected with an anti-full length IKK γ /NEMO antibody, but not with an antibody recognizing the N-terminal region of the protein (data not shown), further

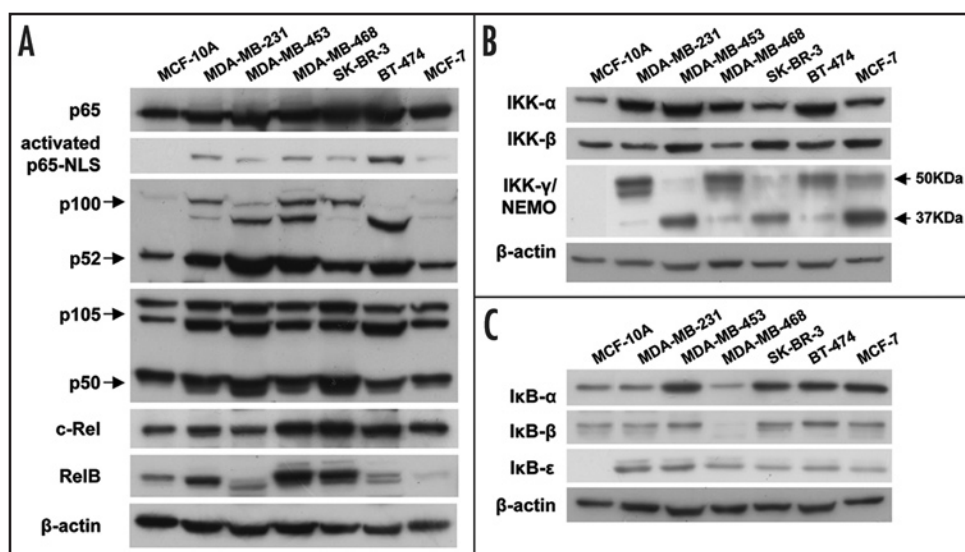


Figure 2. Characterization of the NFκB pathway proteins expression in breast cancer cell lines. (A) The NFκB subunits. An anti-activated p65 (NLS specific) antibody was also used. Western Blot of p50 shows a 50 kDa band and a 105 kDa precursor band. Western blot of p52 shows a 52 kDa band and a 100 kDa precursor band. In both cases additional bands are also seen. (B) The three IKK isoforms and (C) the IκB proteins. Total extracts were obtained from six breast cancer cell lines under basal conditions. The epithelial MCF-10A cell line was used as control.

indicating that the 37 kDa band represents an IKKγ/NEMO fragment with a truncated N-terminus rather than C-terminus. Nevertheless, both Northern blot and RT-PCR assays (data not shown) detected only one mRNA size for IKKγ/NEMO, suggesting the possibility that the shorter protein IKKγ/NEMO isoform is generated by a post-translational event. Expression of inhibitory IκBs proteins showed that IκB-α was higher in MDA-MB-453, SK-BR-3, BT-474 and MCF-7. IκB-β was undetected in MDA-MB-468 and IκB-ε expression was similarly expressed in all malignant cell lines.

These results show heterogeneity in the expression of individual members of the IKK/NFκB pathways. A lower expression of members of the alternative NFκB pathway, p100 and RelB, was observed in two cell lines, BT-474 and MCF-7. Globally, it appeared that cell lines with a predominant expression of members of the canonical pathway, such as BT-474 and MCF-7, were less sensitive to doxorubicin. However, this correlation could be merely coincidental.

Inhibition of NFκB by bortezomib and NBD inhibitory peptide enhanced doxorubicin sensitivity in BT-474 Cells. The next set of experiments was focused in studying a possible NFκB involvement in the resistance to doxorubicin. For these experiments, BT-474 cells were chosen because were relatively resistant to doxorubicin in our panel, had a predominant expression of members of the canonical pathway and also showed a greater expression of NLSp65 subunit. In a first step, NFκB-DNA binding activity following doxorubicin treatment was analyzed by EMSA. BT-474 cells were treated with 15 μM doxorubicin or with 10 ng/ml TNFα (as a positive control). These conditions were chosen after performing time-response assays and selecting the doxorubicin concentration at its IC₂₅. Both TNFα and doxorubicin induced a marked NFκB DNA binding compared with untreated cells (Fig. 3A). Specificity was verified by competition with a 25-fold excess of unlabeled NFκB-probe. As shown in Figure 3A, the indicated NFκB-DNA complexes were substantially removed by adding an excess of cold NFκB probe (specific probe).

Similar levels of the control oligonucleotide for Oct1 binding in the different samples confirm that the observed differences in NFκB activity are not due to differences in the integrity of nuclear extract used in this experiment. Additionally, EMSA supershift assay, with specific NFκB subunits antibodies, showed that doxorubicin-induced NFκB contains at least the p50 and p65 subunits; two specific bands could be identified: the lower band as the p50/p50 homodimer and the upper band as the p50/p65 heterodimer (Fig. 3B). Experiments of p65 and p50 co-localization were also performed by IF. The p65-p50 complexes (identified as yellow merged signals) were detected in most of TNFα or doxorubicin treated cells (Fig. 3C).

We then studied whether blocking NFκB activation could improve doxorubicin effects on cytotoxicity. To perform these studies we used two different NFκB inhibitors that act at different levels on the NFκB pathway: BTZ, a proteasome inhibitor¹⁶⁻¹⁸ that prevents IκB-α degradation, and therefore keeps NFκB dimers at the cytoplasm; and a NEMO-binding domain-(NBD) inhibitory peptide, which consists on an amino-terminal α-helical region of IKKγ/NEMO associated with a carboxy-terminal segment of IKKα and IKKβ, that it blocks the IKK complex formation.^{19,20} Molecular effects of both NFκB inhibitors were assayed by Western blot. For these experiments, NFκB activation was assayed using an antibody specific for phosphorylated p65 (P-p65). p65 is phosphorylated in Ser536 in the C-terminal transactivation domain during the phosphorylation and degradation of IκBs. Doxorubicin treatment resulted in both p65 phosphorylation and IκB-α degradation (Fig. 4A). Cells were treated with 1 μM BTZ or with 10 μM NBD-inhibitory peptide for 90 min, and then exposed to 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNFα for 4 h. Pre-incubation with BTZ (Fig. 4B) or NBD-inhibitory peptide (Fig. 4C) prevented doxorubicin induced p65 phosphorylation.

Cotreatment of BT-474 cells with doxorubicin and with NBD or BTZ reduced cell viability to a greater extent than doxorubicin alone, NBD alone or BTZ alone. NFκB implication in cellular doxorubicin resistance was shown when BT-474 cells were treated with doxorubicin combined or not with NFκB inhibitors for 48 h and revealed in a MTS assay (Fig. 4D). The combination with BTZ or NBD-inhibitory peptide enhanced by 30% and 40%, respectively, doxorubicin cytotoxicity. Notably, NBD-inhibitory peptide plus doxorubicin resulted in greater effects on cell viability than bortezomib plus doxorubicin. The observations that NBD-inhibitory peptide had only slight effects on cell viability when used alone, while it markedly enhanced the effects on doxorubicin, supported a role of NEMO in mediating doxorubicin resistance under our assayed conditions.

Silencing p65, p52, c-Rel and IKKγ/NEMO but not RelB by siRNA potentiated doxorubicin cytotoxicity. The results obtained in BT-474 cells, including the relative resistance to doxorubicin in a context of predominant expression of members of the canonical

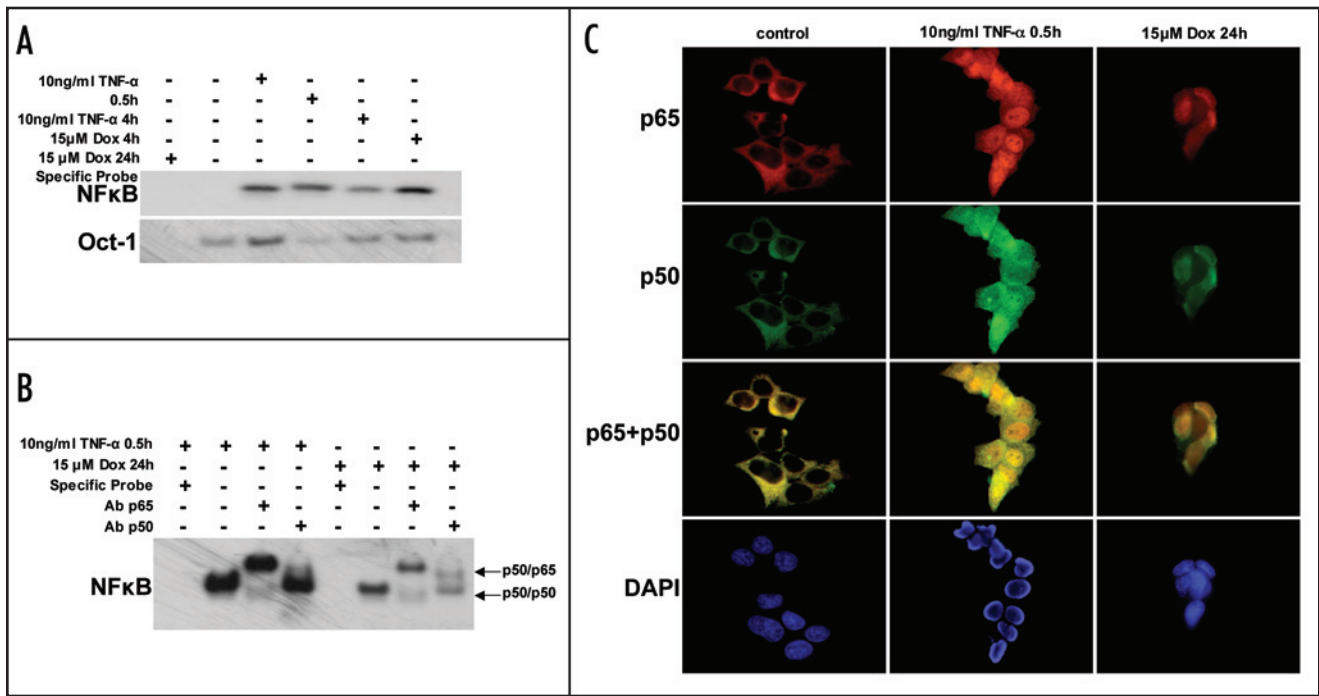


Figure 3. Doxorubicin NFκB-DNA binding activity induction in BT-474 breast cancer cells. (A) EMSA assay of nuclear protein extracts from BT-474 cells treated with 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNFα at selected times. Radiolabeled oligonucleotides probes containing NFκB (upper panel) or Oct1 (lower panel) DNA binding motifs were used. After treatments, a substantially enhanced NFκB binding complex was observed in the nuclear extract of cells. The specificity of the NFκB-DNA complex was ascertained by competition study. (B) The position of NFκB-DNA complexes containing p50/p65 or p50/p50 dimers (as determined by EMSA supershift assays) are indicated. (C) After treatment, cells were stained by double antibody immunofluorescence. Nuclei of cells are stained with DAPI. The p65-p50 complexes (identified by yellow merged signals) were detected in nuclei in most of TNFα treated cells. Similar findings were observed for doxorubicin-treated cells.

pathway and the chemosensitization obtained by NBD-inhibitory peptide (which should affect only the activation of the canonical pathway), suggested that the canonical pathway was involved in doxorubicin resistance. In an attempt to further understand the role of individual IKK/NFκB subunits in doxorubicin resistance, siRNA oligonucleotides were designed for selected proteins of the pathway. For this purpose, HeLa cells were chosen for the siRNA assays due to their high transfection efficiency compared with the poor efficiency achieved in BT-474 cells (data not shown). HeLa cells are derived from cervix carcinoma, a tumor type also treatable with doxorubicin. Activation of NFκB in HeLa cells exposed to doxorubicin was observed. A 4 h treatment with doxorubicin induced p65 phosphorylation and concomitant IκB-α degradation in HeLa cells (Fig. 5A). NFκB subunits (p65, c-Rel, RelB, p50, p52, p105) were assayed by Western blot in HeLa nuclear extracts treated with doxorubicin or TNFα (positive control) (Fig. 5B). All subunits were detected in the nucleus in response to doxorubicin or TNFα exposure in a higher extent than in control cells.

The efficiency of the designed siRNA oligonucleotides was tested by Western blot. Cells were transfected with different DNA amounts and lysed at different times to find out the best combination. A decrease of protein levels of the corresponding NFκB subunits was observed after three days of transfection with 6 μg of the corresponding siRNA vector (Fig. 6A).

We next performed viability assays, in which cells were transfected with the respective siRNA, kept resting and three days later treated with doxorubicin for 24 h. siRNA transfected cells did not exhibit evident effects on cell viability versus empty vector

transfected cells. Transient silencing of p65, p52, c-Rel or IKKγ/NEMO enhanced approximately by 30% the cytotoxicity of doxorubicin (% cell viability: control p65 84.2% ± 6.6%, p65 51.5% ± 3.1%; control pSUPER 85.9% ± 3.5%, p52 51.4% ± 1.6%, c-Rel 59.8% ± 2.18%, IKKγ/NEMO 53% ± 1.9%)(p < 0.05, data not shown). However, silencing RelB subunit, which only participates in the non canonical NFκB pathway, had much less effect on doxorubicin cytotoxicity (cell viability of 78% ± 7.55%) (Fig. 6B).

DISCUSSION

In the present work we observed diversity in the expression of individual members of the IKK/NFκB pathway among different human breast cancer cell lines. A possible link between predominant expression of members of the canonical pathway and doxorubicin resistance was suggested from these studies. Furthermore, inhibition of the canonical NFκB pathway was sufficient to increase doxorubicin cytotoxicity in two different human tumor cell types (breast and cervix carcinomas) as assayed by a pharmacological and a genetic approach.

NFκB activation is a frequent event mediated by many chemotherapeutic agents,²¹ which commonly implies the induction of a strong anti-apoptotic response that limits the efficacy of the treatment.¹ The same mechanism of resistance can occur with hormonal treatments and with radiation therapy.^{8,22} We aimed our studies to gain further insight in the relationship between IKK/NFκB expression/activation and the cytotoxicity of doxorubicin in two human cancer types where this agent is employed in clinical settings.

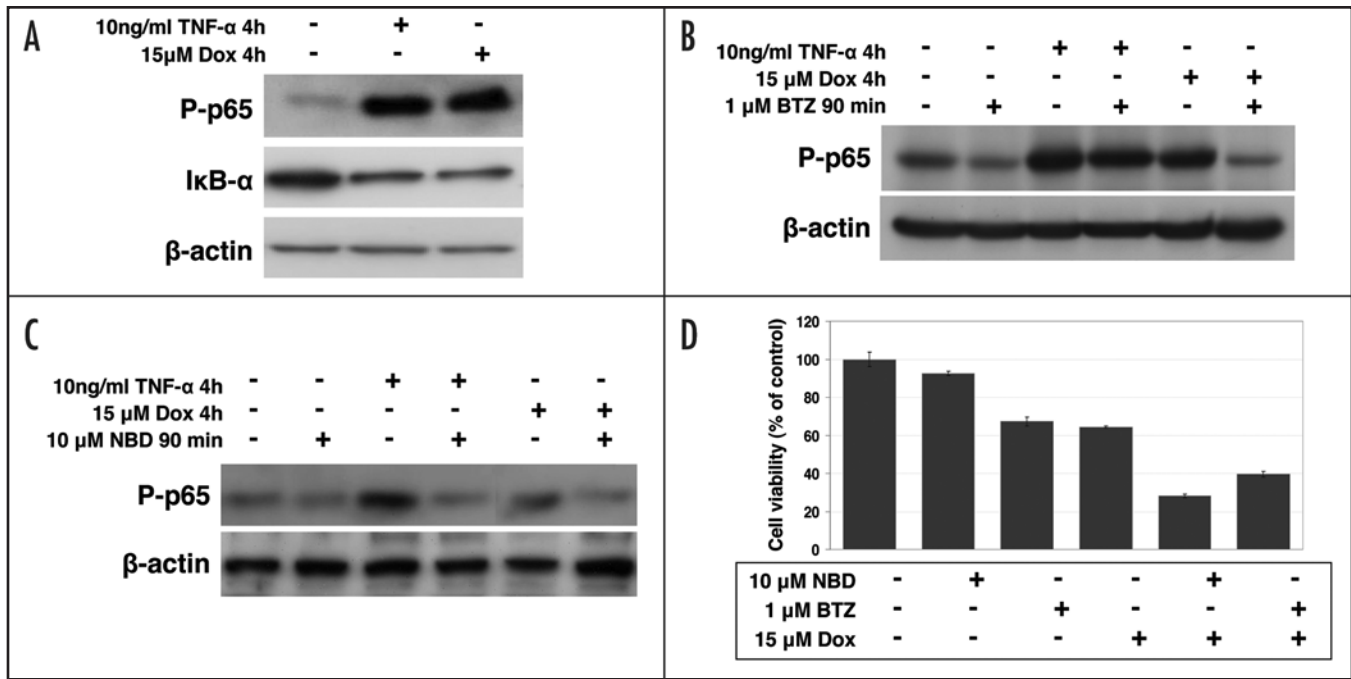


Figure 4. Effects of NFκB inhibitors on NFκB activity and on doxorubicin effects in BT-474 cells. (A) Western blot of BT-474 total protein extracts against phosphorylated p65 and IκB-α proteins. Cells were treated with 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNFα (positive control) for 4 h. β-actin was used to check protein loading. In both cases, NFκB is activated. (B) Western blot of BT-474 cells treated with BTZ for 90 min, and then exposed to 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNFα for 4 h. In both cases, pre-incubation with BTZ decreased p65 phosphorylation compared with controls. (C) Western blot of BT-474 cells treated with NBD-inhibitory peptide for 90 min, and then exposed to 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNFα for 4 h. Pre-incubation with NBD-inhibitory peptide before adding doxorubicin or TNFα decreased p65 phosphorylation compared with controls. (D) BT-474 cells were treated with 15 μM doxorubicin combined or not with two different NFκB inhibitors: 10 μM NBD-inhibitory peptide, and 1 μM BTZ for 48 h. Results were revealed by MTS assay and confirmed twice more. The cytotoxicity of doxorubicin in combination with either BTZ or NBD-inhibitory peptide was enhanced in a 30% and 40% respectively.

It is well known that anthracyclines, such as doxorubicin, target DNA topoisomerase II resulting in DNA damage, a critical signal to switch on NFκB.¹⁰ Moreover, it has been previously reported that in response to double strand DNA breaks IKKγ/NEMO is retained in the nucleus, where it is modified by SUMO and phosphorylated by the ATM kinase,²³ then it translocates to the cytoplasm and joins IKKβ and IKKα for IKK complex formation and NFκB activation.^{24,25} Consequently, it was hypothesized that doxorubicin efficiency could be augmented by repressing the activation of NFκB. Along this line, it has been described that NFκB inhibition sensitizes tumour cells to anthracyclines therapy²⁶ and more specifically to doxorubicin treatment.^{7,27-29} From a clinical perspective, we recently showed that activation of NFκB, determined by NFκB/p65 nuclear immunostaining in tumor cells, significantly correlated with resistance to anthracycline-based chemotherapy in breast cancer patients.¹² Furthermore, the number of patients with NFκB/p65 activation increased after chemotherapy exposure. That study revealed a link between activation of the canonical pathway (using nuclear p65 translocation as a surrogate marker of activation) and resistance to anthracyclines. Other elegant studies have reported similar findings in breast cancer as well as in other tumor types.^{6,7,30} Notably, NFκB/bcl-2 pathway has been shown to correlate with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer.⁶ These novel *in vivo* data strongly supported a role of NFκB activation, and in particular of the canonical pathway, as a cellular mechanism of resistance to anticancer therapy and suggested that NFκB/p65 was inducible by chemotherapy in patients.

We assayed the expression of most of the proteins participating in the IKK/NFκB pathways; the five NFκB members, the three IKK isoforms, and three of the inhibitory IκBs. Many of these proteins were overexpressed in breast cancer cell lines compared to the non-malignant breast epithelial cell line MCF-10A. In addition, there was heterogeneity among different cell lines. MCF-10A cells, as assayed by MTS, had an intermediate degree of sensitivity to doxorubicin with regards to our panel of malignant breast cancer cell lines. This result is similar (i.e., viability of MCF-10A cells affected by anticancer drugs to a similar extend than some malignant cells) to findings using other agents.³¹ Although this part of the work was merely descriptive, it raised several observations of potential importance for future studies. First, the molecular mechanisms underlying the overexpression or the downmodulation (even to undetected levels) of key proteins of this system are largely unknown. In particular, a shorter form for IKKγ/NEMO (~37 KDa) was detected in some lines by both an anti-full length IKKγ/NEMO antibody and an anti C-terminal antibody, while another antibody against the N-terminal extreme did not detect it. On the other hand, both Northern Blot and RT-PCR assays revealed a single mRNA size for IKKγ/NEMO. Altogether, these experiments suggest the possibility of a new short form for IKKγ/NEMO protein as a result of post-translational processing. Second, two cell lines, MCF-7 and BT-474 had a conserved expression of all the key members of the canonical pathway assayed. These two cell lines were relatively resistant to doxorubicin, thus indirectly suggesting that the integrity of the canonical pathway might be related to resistance to this agent. Due to these findings, we focused our additional studies in BT-474 breast cancer cells.

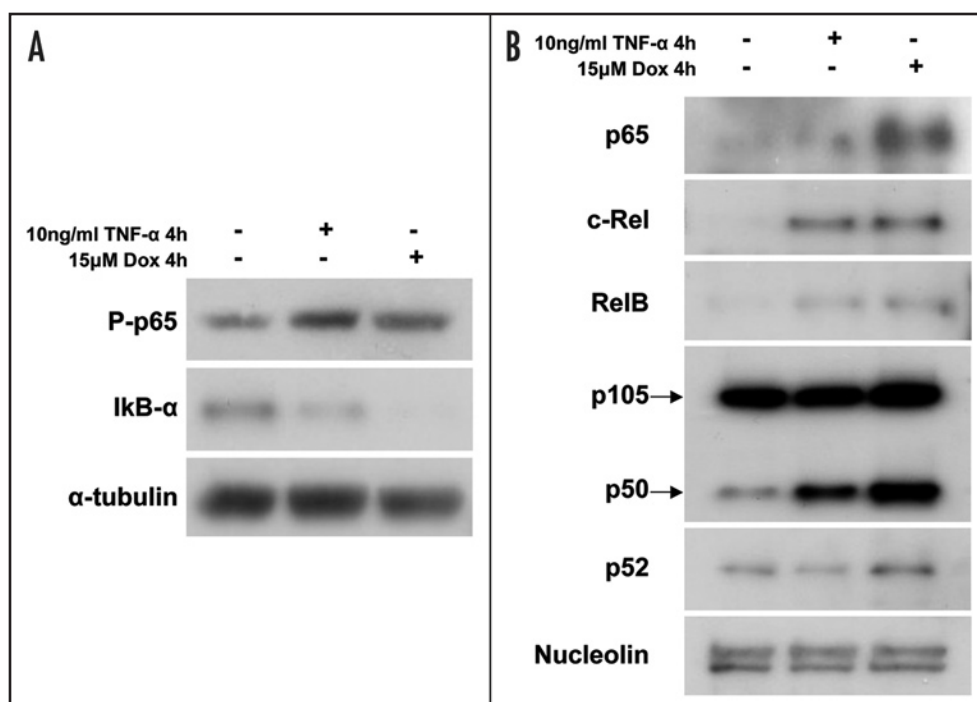


Figure 5. Doxorubicin induction of NFκB in HeLa cells. (A) Western blot from HeLa total extracts against P-p65 and IκB-α proteins. Cells were treated with 15 μM doxorubicin or 10 ng/ml TNF-α (positive control) for 4 h. To check protein loading we used α-tubulin. Results show p65 activation after the treatment. (B) HeLa nuclear extracts treated as in (A) were analyzed by Western blot with antibodies against p65, c-Rel, RelB, p50/p100, and p52 proteins. All assayed proteins translocated to the nucleus in response to doxorubicin treatment. Nucleolin was used as a control.

In BT-474 cells, doxorubicin promoted IκB-α degradation, concomitantly with p65 phosphorylation, and induction of NFκB DNA binding. We then investigated the chemosensitizing effects of two different NFκB inhibitors; BTZ and NBD-inhibitory peptide. The first agent, BTZ, is a proteasome inhibitor already approved in many countries for the treatment of patients with multiple myeloma and in further clinical development in multiple tumor types. The role of BTZ in NFκB inhibition is indirect and mediated by its effect in the canonical pathway. Proteasome inhibition prevents IκB degradation and therefore abrogates p65 nuclear translocation. However, BTZ affects many other key intracellular proteins and therefore the effects on NFκB are not the sole mechanism of antitumor action of this agent. In a previous study we also found that MCF-7 and BT-474 cells were the most resistant to BTZ.¹⁸ We also investigated here the effects of NEMO-binding domain-(NBD) inhibitory peptide, which selectively blocks the canonical pathway by disrupting the IKK complex. Both agents, BTZ and NBD- inhibitory peptide, augmented doxorubicin cytotoxic effects by 30% to 40% under our experimental conditions. Thus, NFκB inhibitors improved doxorubicin treatment in BT-474 breast cancer cells, which adds additional support to the hypothesis of the NFκB pathway as involved in tumor resistance to doxorubicin, and pointed to a key role of the canonical pathway in this effect. We cannot rule out that effects other than NFκB inhibition contribute to this enhanced tumoricidal effect, since both NBD inhibitory peptide and BTZ when used alone reduced cell viability. However, the effects of NBD inhibitory peptide on cell viability were modest while it greatly enhanced doxorubicin effects.

We next performed small interference RNA experiments in HeLa cells to explore the role of individual members on doxorubicin response. We confirmed that doxorubicin induced IκB-α degradation and p65 phosphorylation, together with nuclear translocation of NFκB subunits (p65, c-Rel, RelB, p50, p52 and p105). siRNA assays against the selected NFκB proteins -p65, p52, c-Rel- as well as with IKKγ/NEMO, increased about 30–40% doxorubicin cytotoxicity. The death increase obtained by silencing p52 is in line with a recent publication,³² which describes that p52/RelB heterodimers only participate in the alternative pathway, while p52/p65 or p52/c-Rel heterodimers are controlled by IκB inhibitors and finally activated by the IKK complex in the canonical pathway. In contrast, silencing RelB, which participates selectively in the alternative NFκB pathway, had only minor effects on doxorubicin cytotoxicity. Preliminary experiments using siRNA constructions in combination with another chemotherapeutic agent widely used, docetaxel (Taxotere), which is also known to activate NFκB,⁷ suggested similar results (data not shown).

Our results indicate that selective inhibition of the chosen subunits of the classical IKKNFκB pathway was sufficient to increase doxorubicin antitumor effects. The work presented here reveals diversity in expression of individual members of the IKK/NFκB pathway among different human breast cancer cell lines. This observation raises additional support to the need of further functional studies as well as assays in tumor samples from patients. From a functional perspective, inhibition of the canonical NFκB pathway was sufficient to increase the cytotoxicity of doxorubicin in two different human tumor cell types (breast and cervix carcinomas) as shown by two approaches (pharmacological and genetic). These findings show that selective inhibition of the canonical IKKNFκB pathway is sufficient to improve doxorubicin antitumor effects in the studied models, an observation that should be taken into account for further development of IKK/NFκB inhibitors as chemosensitizing agents.

Acknowledgements

This work has been supported by SAF 2003-08181 grant (Spanish Science and Technology Ministry, MCYT) (A.R., P.G., J.A.), GEN2003-20243-C08-08 grant (Spanish Science and Technology Ministry, MCYT) (J.A.), PI051305 (R.P), PI061513 (J.A, A.R) grants (Spanish Health Ministry Grant “Fondo de Investigación Sanitaria”), RICC 2007 (RD06/0020/0109) and Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)/Catalunya contra el Cáncer 2002 (A.R., P.G., J.A.) and 2006 (A.R., J.A.). A.R. acknowledges a fellowship from la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (AECC). We also thank Fundació Cellex (Barcelona), for a generous donation to the Laboratory of Experimental Oncology and URTEC.

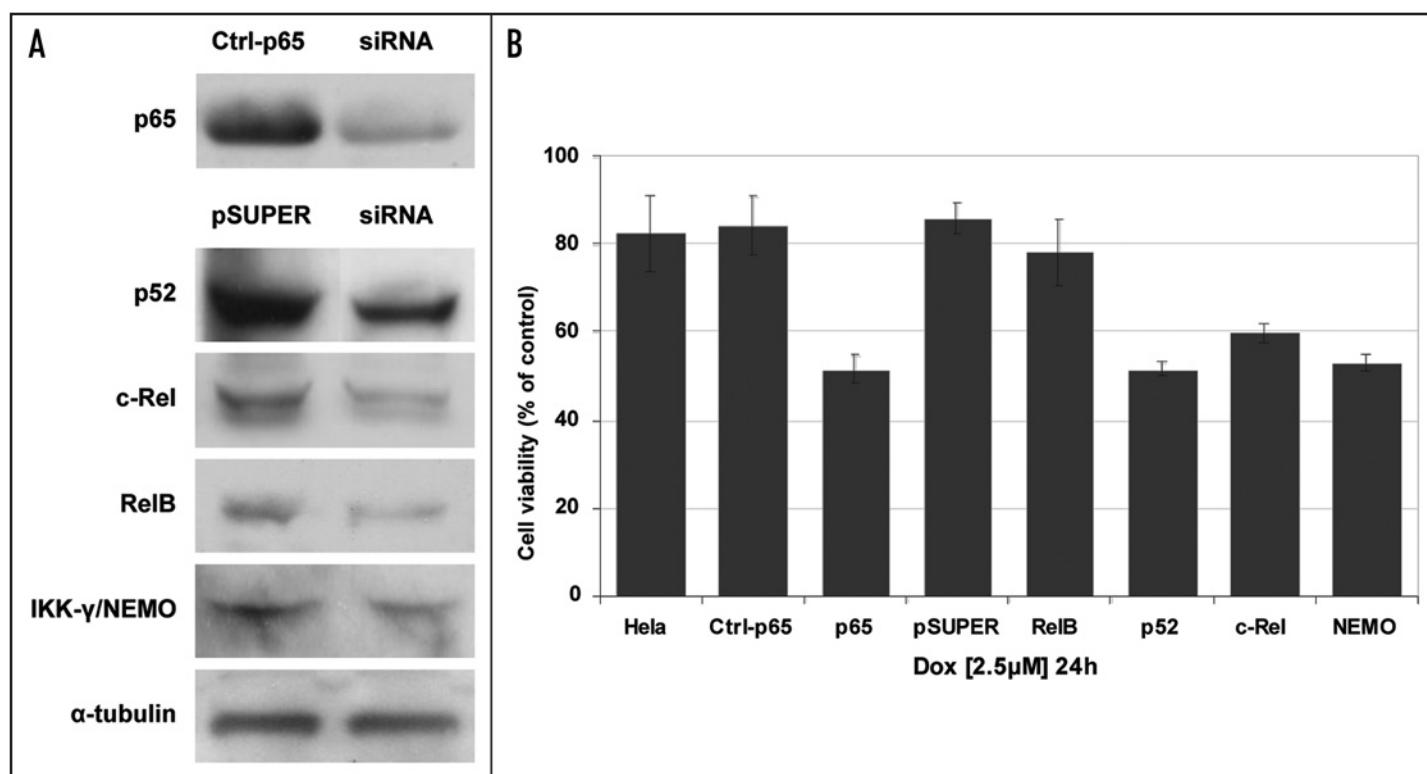


Figure 6. siRNA inhibition of NFκB sensitizes HeLa cells to chemotherapy. HeLa cells were transiently transfected with either siRNA directed against a specific NFκB proteins or mock-transfected (control). Transfected cells were grown in culture media without doxorubicin during three days. Then Western blot or MTS assays were performed. (A) Western blot. Extracts of the cells were prepared at three days after transfection and analyzed for p65, p52, c-Rel or RelB and tubulin expression by Western blot analysis. All siRNA promoted a decrease in their corresponding protein levels. A representative load control is shown. (B) MTS assay. After three days of transfection, the control and each NFκB siRNA- transfected HeLa cells were seeded in 96 well-plates and cultured either with or without doxorubicin. The next day, cell viability was evaluated by MTS assay. Ctrl-p65: control vector for p65 construction; pSUPER: control vector for RelB, p52, c-Rel and IKKγ/NEMO constructions.

References

- Greten FR, Karin M. The IKK/NFκappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206:193-9.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NFκappaB in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:301-10.
- Moynagh PN. The NFκappaB pathway. *J Cell Sci* 2005; 118:4589-92.
- Karin M, Lin A. NFκappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3:221-7.
- Tanaka A, Muto S, Konno M, Itai A, Matsuda H. A new IkappaB kinase beta inhibitor prevents human breast cancer progression through negative regulation of cell cycle transition. *Cancer Res* 2006; 66:419-26.
- Buchholz TA, Garg AK, Chakravarti N, Aggarwal BB, Esteva FJ, Kuerer HM, Singletary SE, Hortobagyi GN, Pusztai L, Cristofanilli M, Sahin AA. The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8398-402.
- Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:6934-42.
- Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, Cheng AL. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NFκappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1709-16.
- Wang CY, Cusack JC, Liu R, Baldwin AS. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NFκappaB. *Nat Med* 1999; 5:412-7.
- Ho WC, Dickson KM, Barker PA. Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:4273-81.
- Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: A brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61:7785-91.
- Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C, Suarez M, Fabregat X, Campo E, Gascon P, Serrano S, Fernandez PL, Rovira A, Albanell J. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:607-16.
- Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997; 11:463-75.
- Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci* 2004; 24:7324-34.
- Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, Fresno-Vara JA, de Castro-Carpeño J, Casado E, Nistal M, Gonzalez-Barón M, Perona R. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2006; 25:3335-45.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59:2615-22.
- Adams J. The proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:349-60.
- Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:665-75.
- Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, Sudo T, Kojima T, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K, Ohya K, Ghosh S. Selective inhibition of NFκappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med* 2004; 10:617-24.
- May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NFκappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 2000; 289:1550-4.
- Das KC, White CW. Activation of NFκappaB by antineoplastic agents: Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272:14914-20.
- Boland MP, Fitzgerald KA, O'Neill LA. Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor kappa B activation in HL60 cells. *J Biol Chem* 2000; 275:25231-8.

23. Panta GR, Kaur S, Cavin LG, Cortés ML, Mercurio F, Lothstein L, Sweatman TW, Israel M, Arsura M. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF κ B through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 2004; 24:1823-35.
24. Bartek J, Lukas J. Cell biology: The stress of finding NEMO. *Science* 2006; 311:1110-1.
25. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/I κ B γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF κ B activation by genotoxic stress. *Cell* 2003; 115:565-76.
26. Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S, Binaschi M. NF κ B activation contributes to anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *Int J Oncol* 2005; 27:799-806.
27. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Cheng AL. Involvement of nuclear transcription factor-kappa B in low-dose doxorubicin-induced drug resistance of cervical carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:25-33.
28. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE, Price JE. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7490-8.
29. Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S, Venuta S. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF κ B/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer* 2004; 40:2829-36.
30. Domingo-Domenech J, Mellado B, Ferrer B, Truan D, Codony-Servat J, Sauleda S, Alcover J, Campo E, Gascon P, Rovira A, Ross JS, Fernández PL, Albanell J. Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. *Br J Cancer* 2005; 93:1285-94.
31. Ripple MO, Kalmadi S, Eastman A. Inhibition of either phosphatidylinositol 3-kinase/Akt or the mitogen/extracellular-regulated kinase, MEK/ERK, signaling pathways suppress growth of breast cancer cell lines, but MEK/ERK signaling is critical for cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93:177-188.
32. Dejardin E. The alternative NF κ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:1161-79.

